



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

EFEITO DO TREINO NA NEUROBIOQUÍMICA CEREBRAL DO CÃO

Rita Tique Arriaga Teles

Orientação: Prof. Dr. Alfredo Pereira

Dr. Nuno Paixão

Mestrado em Medicina Veterinária

Dissertação

Évora, 2017



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

EFEITO DO TREINO NA NEUROBIOQUÍMICA CEREBRAL DO CÃO

Rita Tique Arriaga Teles

Orientação: Prof. Dr. Alfredo Pereira

Dr. Nuno Paixão

Mestrado em Medicina Veterinária

Dissertação

Évora, 2017

*Ao meu cão Marley que, em horas difíceis, fez revelar o melhor de mim.
Houve, sem dúvida, modificação comportamental, só não foi ele que mudou.*

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus orientadores, ao Prof. Doutor Alfredo Pereira, que me orientou durante todo o processo, com extrema paciência devo salientar, dando sempre soluções para os problemas que teimaram em aparecer e ao Dr. Nuno Paixão, que criou toda a ideia, desafiando-me muito mais do que eu inicialmente esperaria. Este tema não teria sido trabalhado se não fosse sugerido pelo Dr. Nuno e não teria sido concluído sem o seu apoio e do Hospital VetCentral.

Seguidamente gostaria de agradecer a toda a equipa do Hospital VetCentral por me abrirem as portas e permitirem que eu aprendesse com eles, com especial relevância à Dra. Andressa Rigo que tornou a aprendizagem muito mais divertida.

Deixo aqui um meu grande apreço e gratidão para com os tutores dos cães que participaram neste estudo, pela amabilidade e pela confiança que depositaram em mim.

Agradeço também à minha academia, Universidade de Évora, em especial a todos os docentes que partilharam o seu conhecimento, e que todos os dias dão o seu máximo para que nós, alunos, tenhamos uma boa formação, apesar de todas as condicionantes dos dias de hoje.

Nada neste percurso se fez sozinho. Foi bom poder contar com o apoio do meus colegas e amigos, pessoas que, num mundo tão competitivo, souberam promover o espírito de grupo, de entreajuda e companheirismo. Apoiámo-nos mutuamente em épocas difíceis e, felizmente, vivemos com alegria o sucesso de cada um: Joana Rafael, Joana Tavares, Monica Nunes, Catarina Paiva, Catarina Mendes, Eurico Correia, Ana Maria Oliveira, Inês Duarte, João Sousa e Daniela Clemente.

Por fim, e porque os últimos são sempre os primeiros, gostaria de agradecer à minha família todo o apoio incondicional que me deram. Estou eternamente grata pelo esforço que fizeram e a dedicação que tiveram para que eu encontrasse o meu caminho, respeitando os meus tempos e sem nada cobrar. Nunca irei conseguir retribuir de volta todo o amor, mas espero que se orgulhem da pessoa que me tornei.

Obrigada!

I. RESUMO

Com o objetivo de perceber de se o treino afeta a comunicação química do cérebro canino de uma forma permanente, estudaram-se dois grupos de cães: um grupo de cães treinado com marcadores e outro grupo sem contacto com nenhum tipo de treino. Foram recolhidas amostras sanguíneas dos dois grupos e medidas as concentrações de serotonina e dopamina. Os valores médios encontrados para a serotonina e dopamina para o grupo de controlo foram de 269.66 µg/l 56,97 ng/l respetivamente. Para a serotonina, a comparação das médias revelou diferenças entre os grupos ($p=0,087$), havendo uma diminuição no grupo de cães treinados. Já a dopamina não se verificou ser diferente entres os dois grupos estudados ($p=0,2$). As vias dopaminérgicas ativadas em situações de compulsão/adicação são as mesmas que se ativam no circuito do reforço. Também os valores de serotonina estão diminuídos nesses casos, sugerindo que poderá haver uma componente compulsiva/aditiva em cães treinados.

Palavras Chave: treino, serotonina, dopamina, neurobioquímica, aprendizagem canina

II. ABSTRACT

The effect of training markers in the cerebral neurochemistry of the dog

To understand if dog training affects permanently the chemical communication of canine brain, two groups of dogs were studied: one group had dogs trained with markers and the other one had dogs without any type of training. Blood samples were collected from both groups and concentrations of serotonin and dopamine were measured. The mean values found for serotonin and dopamine for the control group were 269.66 µg/l and 56.93 ng/l respectively. Comparison of means of the groups revealed different values of serotonin between the two groups (p -value= 0,087) having a decrease in serotonin in the trained dog group. As for dopamine, it was not found to be different between the two groups studied (p -value=0,2). The dopaminergic pathways activated in compulsion/addiction situations are the same ones that activate in the reinforcement circuit. Also, serotonin levels are decreased in these cases, suggesting that there may be a compulsive/additive component in trained dogs.

Key-words: training, serotonin, dopamine, neurobiochemistry, canine learning

III. ÍNDICE

I. RESUMO	V
II. ABSTRACT	VI
IV. TABELA DE FIGURAS	IX
V. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	X
VI. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	11
1. A Aprendizagem.....	11
1.1. A Neuroanatomia, neuroquímica e a biologia molecular da aprendizagem.....	11
1.1.1. Neuroanatomia e sua função	11
1.1.2. Os Aspetos Celulares e Moleculares da Aprendizagem.....	15
1.1.3. Neurotransmissores	16
1.1.3.1. Acetilcolina	18
1.1.3.2. Glutamato e GABA.....	18
1.1.3.3. Dopamina	19
1.1.3.4. Serotonina.....	23
1.1.3.5. Péptidos Opiáceos	26
1.1. Teoria da Aprendizagem	27
1.1.1. Condicionamento Clássico	27
1.1.2. Condicionamento Operante.....	29
1.1.2.1 As 4 categorias do condicionamento operante	29
1.1.3. O Reforço	31
1.1.4. Comunicação.....	34
1.1.5. Condicionamento Clássico vs. Condicionamento Operante	34
2. Treino com Marcadores.....	36
2.1. Marcadores vocais.....	37
2.2. Treino com Clicker.....	38
2.3. Diferenças entre os marcadores de voz e o clicker.....	39
2.4. Neurobioquímica dos marcadores de treino.....	39
2.5. Técnicas de Treino	40
VII. OBJETIVOS.....	42
VIII. MATERIAIS E MÉTODOS	43
1. Tipo de estudo	43
2. Critérios de Seleção.....	43
4. Recolha de dados.....	45

IX. RESULTADOS	46
1. Caracterização da Amostra.....	46
2. Resposta Comportamental.....	48
3. Serotonina.....	51
4. Dopamina	55
VII. DISCUSSÃO	59
VIII. CONCLUSÃO	63
IX. BIBLIOGRAFIA.....	64
X. ANEXOS.....	71

IV. TABELA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração do hipocampo e fórnix de um cérebro humano. Vista longitudinal superior (Netter, 2013)	12
Figura 2 - A formação hipocampal (Andersen, et al., 2007)	13
Figura 3 - Mecanismos envolvidos na iniciação e manutenção da plasticidade sináptica (Ruggiero, et al., 2011)	16
Figura 4 - Transporte Axonal (Waymire, 2016)	17
Figura 5 - Síntese das catecolaminas (Standaert & Galanter, 2009)	20
Figura 6 - Neurotransmissão dopaminérgica (Standaert & Galanter, 2009)	20
Figura 7 - Via dopaminérgica. (Breedlove, et al., 2010)	21
Figura 8 - Via serotoninérgica (Breedlove, at al., 2010)	24
Figura 9 - Regulação pré-sináptica da neurotransmissão da serotonina (Nadal-Vicens, Chyung, & Turner, 2009)	25
Figura 10 - Síntese de Serotonina a partir do triptofano nutricional (Nadal-Vicens, Chyung, & Turner, 2009)	25
Figura 12 - exemplo de uma situação de condicionamento clássico positivo. Adaptado de Case, 2010	28
Figura 11 - Exemplo de uma situação de condicionamento clássico negativo. Adaptado de Case, 2010	28
Figura 13 - Relação entre o Condicionamento Clássico e o Operante no Treino Canino. Adaptado de Case, 2010	35

V. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – 5-hidroxitriptamina
AADC – aminoácido aromático descarboxilase
ACTH - adrenocorticotropina
AMPA - ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
AMPc- Adenosina monofosfato cíclico
DA - dopamina
DAT – transportador de dopamina
DG - giro dentado
EC - córtex entorrinal
EPI - epinefrina
FC – Frequência Cardíaca
FR – Frequência Respiratória
GABA – Acido gama-amino-butírico
GPCR – Recetores acoplados à proteína G
LCR – líquido cefaloraquidiano
L-DOPA - levodopa
LTP – Potenciação a longo prazo
MAO – Monoamina Oxidase
NE - Norepinefrina
NMDA - N-metil D-Aspartato
SERT – Transportador seletivo de serotonina
SNC – Sistema Nervoso Central
SNP – Sistema Nervoso Periférico
TH – Tirosina Hidroxilase
TPH - triptofano hidroxilase
CA - cornu ammonis
TVR - taxa variável de reforço
VMAT - transportador de monoaminas vesicular
VTA – área tegumentar ventral

VI. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1. A Aprendizagem

O comportamento desenvolve-se ao longo da vida como o resultado da interação dos fatores genéticos e ambientais. Embora o genótipo não possa ser alterado, podemos alterar o ambiente de forma a produzir alterações no comportamento, o que implica alterar o ambiente interno do sujeito (intervenção psicológica) e o ambiente externo (intervenção ambiental). A aprendizagem está relacionada com a forma como o comportamento de um animal pode mudar com a alteração do ambiente externo. O treino descreve as técnicas usadas para assegurar que a aprendizagem ocorra de forma previsível em resposta à intervenção humana (Mills, 2006).

De uma forma geral, aprender pode ser definido como uma mudança duradoura nos mecanismos comportamentais, envolvendo estímulos e/ou respostas específicas que resultam de uma experiência anterior com os mesmos estímulos e respostas (Domjan, 2015).

No entanto, outras definições têm vindo a surgir na última década à medida que a ciência explica o processo de aprender. A nível celular aprender pode ser definido como uma mudança celular e também nos recetores como resultado da estimulação neuronal e a produção de novas proteínas (Lombroso, 2004).

Existem dois aspetos da aprendizagem que são essenciais para entender como esta se processa: a primeira são as mudanças neuroanatómicas, neuroquímicas e moleculares que envolvem a aprendizagem, a segunda é a teoria da aprendizagem (Overall, 2013b).

1.1. A Neuroanatomia, neuroquímica e a biologia molecular da aprendizagem

1.1.1. Neuroanatomia e sua função

Durante muito tempo permaneceu a questão se regiões específicas do cérebro participavam de formas específicas na aprendizagem. Hoje, sabe-se que tipos particulares de tarefas são aprendidos dentro de regiões cerebrais específicas. Este conhecimento foi conseguido através de estudos de indivíduos com áreas de lesão cerebral delimitadas que eram acompanhados por perdas de memória muito específicas. Posteriormente, houve confirmação destes resultados através de experiências com roedores (Squire & Kandel, 1999).

As estruturas mais importantes para a aprendizagem associativa são o córtex cerebral, o hipocampo e a amígdala. Outros circuitos mesocorticolímbicos, que usam o núcleo *accumbens* e o *pallidum* ventral são essenciais na estimulação de diferentes tipos de estruturas, relativas à recompensa, que afetam a aprendizagem. (Overall, 2013b)

Hipocampo

O hipocampo é uma estrutura com forma de cavalo marinho que faz parte do sistema límbico. A nível morfológico, o hipocampo é constituído por três divisões: CA1, CA2 e CA3, (CA deriva de *cornu ammonis*). Como ilustrado na figura 1, o hipocampo está localizado na área subcortical, no ventrículo lateral. Em conjunto com o giro dentado (DG), subículo, pré e para-subículo e córtex entorrinal (EC) formam a formação hipocampal (figura 2). Esta formação é uma via excitatória unidirecional de circuito trisináptico: a primeira sinapse entre o EC e o DG; segunda sinapse entre o DG e o CA3; a terceira sinapse entre o CA3 e CA1. Os neurónios do EC projetam-se para o DG pela via perfurante. As células granulosas do DG vão até ao CA3 através das fibras musgosas. Os neurónios piramidais no CA3 projectam-se até ao CA1 pela via colateral de Shaffer (Andersen, et al., 2007).

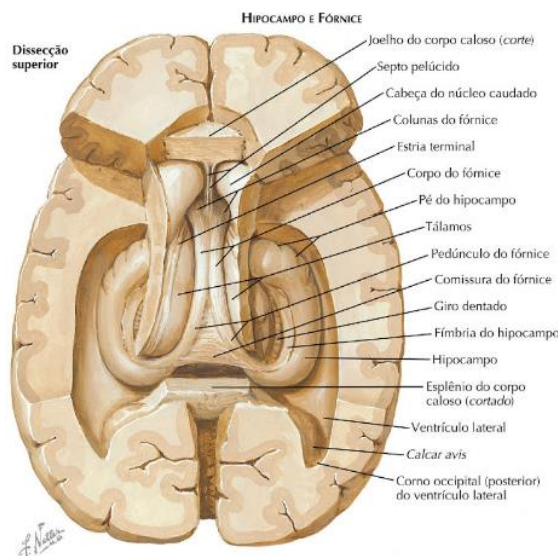


FIGURA 1 - ILUSTRAÇÃO DO HIPOCAMPO E FÓRNIX DE UM CÉREBRO HUMANO. VISTA LONGITUDINAL SUPERIOR. (NETTER, 2013)

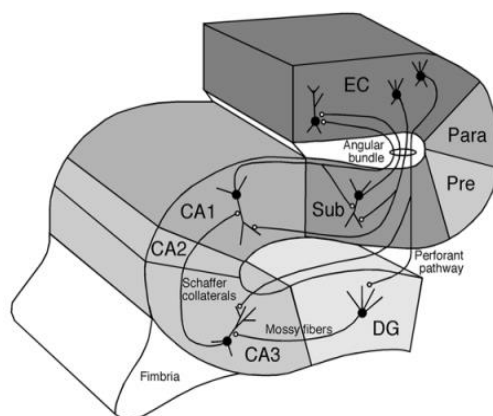


FIGURA 2 - A FORMAÇÃO HIPOCAMPAL. (ANDERSEN, ET AL., 2007)

O hipocampo é de um modo grosseiro considerado a região principal onde a aprendizagem associativa ocorre. Está intimamente ligado com a aprendizagem e com a memória, tendo sido comprovado através de estudos retrospectivos que verificaram que lesões do hipocampo impedem o surgimento de novas memórias explícitas. No entanto, as memórias previamente criadas antes das lesões permanecem intactas. (Lombroso, 2004). Também a memória espacial está ligada ao hipocampo, pois a lesão deste afeta profundamente, e talvez especificamente, a capacidade de localização espacial (Morris *et al.*, 1982).

A aprendizagem e a memória envolvem uma série de estágios: codificação, armazenamento e recuperação. Na codificação ocorrem processos envolvidos na percepção do material de aprendizagem, seguidamente, no armazenamento, as informações codificadas são armazenadas no sistema de memória. A recuperação ocorre quando há extração dessas informações do sistema de memória (Eysenck & Keane, 2017).

A memória é distinguida consoante a sua duração: memória de curto prazo e memória de longo prazo. Esta separação é apoiada pelo modelo do multiarmazenamento que se pressupõe que existem armazenamentos sensoriais separados de curto e longo prazo. Embora hajam algumas evidências científicas que apoiem este modelo, ele ainda continua em estudo (Eysenck & Keane, 2017).

Em relação à memória a longo prazo, Henke (2010) classifica-a em duas classes: a declarativa e não-declarativa. A declarativa é dividida em episódica e semântica, a não-declarativa está dividida em memória procedural, *priming*, condicionamento clássico

simples e habituação/sensibilização. Esta hipótese, de que há várias formas de memória, acompanha a hipótese de que diferentes regiões do cérebro estão associadas a cada uma.

A memória episódica é a forma de memória a longo prazo relacionada com experiências do indivíduo ou a episódios que ocorreram num determinado lugar ou num determinado momento. Segundo a hipótese mencionada acima, a memória episódica depende do lobo temporal medial (incluindo o hipocampo), sendo que o sucesso da memória episódica é precedido de uma atividade intensificada no hipocampo no momento da aprendizagem (Sadeh *et al.*, 2011).

Córtex Cerebral

A aprendizagem associativa também é realizada a partir do córtex, o que é bastante relevante em cães e gatos, tendo em conta que é através dessa via que se processa a aprendizagem relacionada com estímulos olfativos. Com efeito, é no córtex que diferentes estímulos desencadeiam as ações e os comportamentos, ou seja, existem funções múltiplas que incluem, não apenas a integração da informação, mas também a ação de acordo com o estímulo processado. Tendo em conta a informação sensorial seletiva, esta versatilidade funcional ajuda na tomada de decisão entre a ação e inibição, de modo flexível. Assim, quando a aprendizagem associativa ocorre no hipocampo, o córtex ajusta a decisão sobre a ação (Overall, 2013b).

A Amígdala

A amígdala, ou complexo amigdalóide, está localizada no lobo temporal medial e é uma estrutura diversa que contém treze núcleos. Embora haja similaridades entre espécies, também há diferenças de organização e nos tamanhos dos diferentes núcleos. Nos ratos, os núcleos da amígdala dividem-se em três grupos: o grupo profundo ou baso lateral, o grupo superficial ou cortical e o grupo centro medial. Existem ainda alguns núcleos que não se enquadram nestes grupos sendo listados à parte, como a massa de células intercaladas e a área amigdalohipocámpal (Sah *et al.*, 2003).

Há mais de um século que se sabe que o lobo temporal, incluído a amígdala, está envolvido nas emoções. Porém, o entendimento sobre o papel da amígdala está dificultado pela natureza abstrata das emoções. O conhecimento funcional da amígdala

está relacionado com estudos sobre o medo. O medo, seja ele condicionado ou incondicionado, emite uma resposta autónoma e hormonal.

Quando há lesões do complexo amigdalóide a expressão de certos tipos de medo é bloqueada, indicando que é necessário que a amígdala esteja intacta para que o medo seja processado e aprendido (LeDoux, 2003). Estudos evidenciam que diferentes padrões de respostas comportamentais relacionadas com o medo podem ser obtidos quando diferentes partes do complexo amigdalóide são estimuladas (Davis, 1997).

A amígdala também está associada à capacidade de relacionamento social, sendo que em humanos, a disfunção da amígdala em crianças com autismo, poderá ajudar a explicar a grave incapacidade de aprendizagem de normas de relacionamento social (Lombroso, 2004).

1.1.2. Os Aspetos Celulares e Moleculares da Aprendizagem

Como foi referido anteriormente, vários estudos revelaram que a aprendizagem não é só um processo cognitivo, mas também um processo celular (Thompson, Berger, & IV Madden, 1983). Para que a aprendizagem ocorra é necessário haver modificações estruturais e funcionais nos neurónios, bem como a formação de novas proteínas. A nível sináptico, há formação de novas sinapses enquanto que sinapses antigas são fortalecidas. Este fenómeno é designado por plasticidade sináptica e ocorre em todo o cérebro. Genericamente, podemos definir plasticidade sináptica como a capacidade dos sistemas neuronais se adaptarem às exigências, a curto ou longo prazo, da sua atividade ou função. Outro processo que contribui para esta plasticidade é a capacidade de aumentar a taxa de síntese e libertação dos neurotransmissores quando há aumento da atividade neuronal (Lombroso, 2004; Hensler, 2012).

A aprendizagem celular, ou potenciação de longa duração (LTP), é definida como um melhoramento a longo prazo (superior a 30 minutos) na transmissão sináptica, seguido de uma estimulação sináptica de alta frequência (Nicoll & Roche, 2013). Este fenómeno está amplamente descrito para o hipocampo, mais especificamente na região CA1. No entanto, a LTP pode ocorrer também em diferentes partes do cérebro, incluído na amígdala, parte do córtex, substância negra e algumas partes do sistema límbico, apesar de menos estudados (Davis, 1997).

A LTP que ocorre no hipocampo está esquematizada na figura 3. Uma grande quantidade de glutamato é libertada na fenda sináptica após a estimulação de alta frequência. O glutamato vai ligar-se aos recetores da célula pós-sináptica que são do tipo NMDA (N-metil D-Aspartato) e AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico). Quando a célula se encontra no potencial de repouso, estes estão bloqueados pelo ião magnésio (Mg^{2+}) mas após a estimulação vai então ocorrer um influxo de sódio (Na^+) através do recetor AMPA o que leva á despolarização do neurónio pós-sináptico. Seguidamente o Mg^{2+} liberta-se do recetor, permitindo o fluxo de Na^+ e Cálcio (Ca^{2+}). A ativação do recetor NMDA e o aumento de Ca^{2+} intracelular vai ser responsável pela indução da LTP (Ruggiero, et al., 2011).

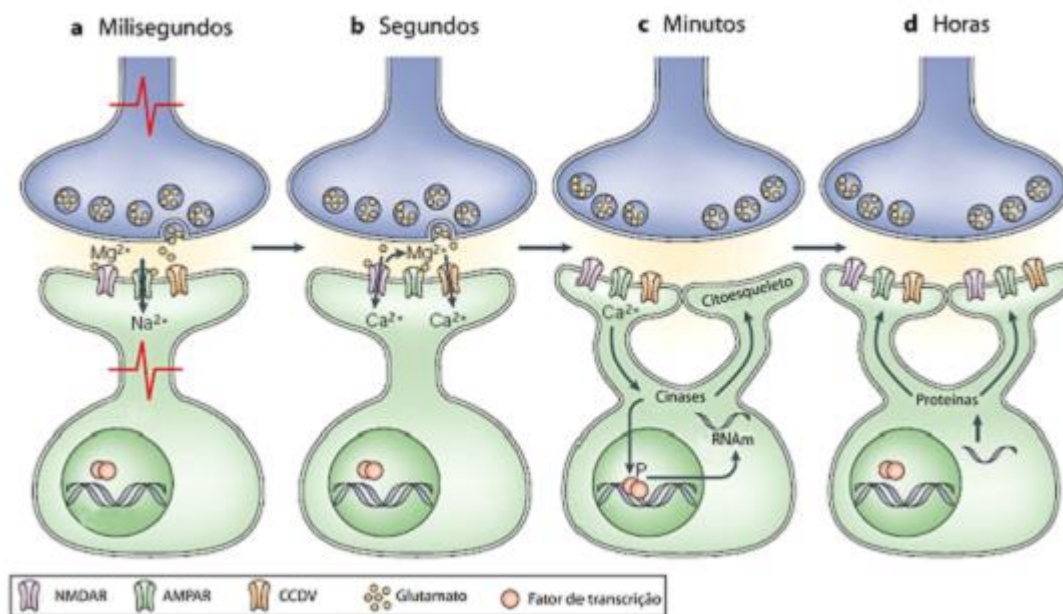


Figura 3 - Mecanismos envolvidos na iniciação e manutenção da plasticidade sináptica (Ruggiero, et al., 2011)

1.1.3. Neurotransmissores

Define-se habitualmente um neurotransmissor como uma substância química que satisfaz quatro critérios: presença no interior das células nervosas em conjunto com as enzimas necessárias para a sua síntese; presença a nível sináptico das enzimas necessárias para a sua inativação; possibilidade de reproduzir os seus efeitos colocando uma substância análoga ao nível da sinapse; presença da substância ao nível do espaço

sináptico no momento da ativação, seja ela espontânea ou induzida eletricamente (Habib, 2003).

Os neurotransmissores são produzidos no corpo celular de neurónios especializados ao nível do retículo endoplasmático, que está disperso pelo citoplasma do neurónio. Depois de produzidos, os neurotransmissores são armazenados em vesículas produzidas pelo aparelho de Golgi. Essas vesículas são posteriormente transportadas até aos microtúbulos do axónio e armazenadas no terminal pré-sináptico. A este processo chama-se transporte axonal (figura 4). A comunicação entre os neurónios é feita, através dos neurotransmissores, nas junções sinápticas entre os neurónios (Lindsay, 2000c).

Existem várias substâncias que se enquadram na definição de neurotransmissor, sendo os mais importantes a acetilcolina, as catecolaminas e a serotonina. Outros transmissores foram sendo descobertos como os péptidos opiáceos e o glutamato. Do ponto de vista anatómico, cada tipo de neurotransmissor possui especificamente a sua própria rede de neurónios de maneira que é possível estruturar a sua função em termos de sistema colinérgico, sistema noradrenérgico e sistema dopaminérgico. Cada um desses sistemas tem uma função própria, sendo possível desenhar um modelo de funcionamento baseado nas propriedades químicas dos constituintes (Habib, 2003). No entanto, querer associar um neurotransmissor a um tipo de resposta comportamental é demasiado simplista, apesar de alguns neurotransmissores intervirem no aumento ou diminuição da neurotransmissão (Pageat, 2000).

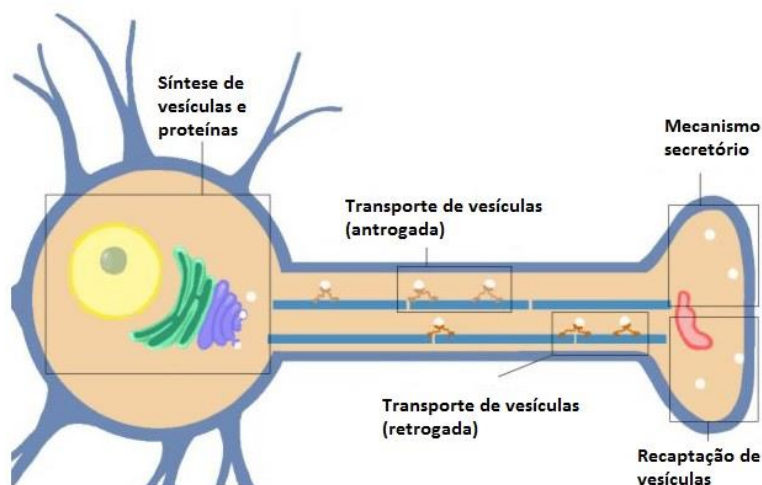


Figura 4 - Transporte Axonal (Waymire, 2016)

1.1.3.1. Acetilcolina

A acetilcolina foi o primeiro neurotransmissor a ser descoberto. Existe no cérebro, na junção neuromuscular e ao nível de certas sinapses do sistema nervoso simpático e parassimpático (Habib, 2003). A acetilcolina atua em certas fibras nervosas, que enervam os músculos esqueléticos, e poderá ter uma função excitatória ou inibitória, dependendo dos locais de atuação. Músculos esqueléticos são excitados pela acetilcolina, enquanto o músculo cardíaco é inibido por ela. Existem dois tipos de recetores, os nicotínicos e os muscarínicos, sendo que os primeiros são ativados para ação excitatória da acetilcolina e os segundos são ativados para a ação inibitória da acetilcolina (Lindsay, 2000c).

1.1.3.2. Glutamato e GABA

O Glutamato e o ácido gama-amino-butírico (GABA) apresentam funções complementares. O glutamato ou ácido glutâmico, que é um neurotransmissor sintetizado a partir de vários aminoácidos, é responsável pela transmissão excitatória, enquanto o GABA é responsável pela transmissão inibitória. Tanto o glutamato como o GABA são reabsorvidos, por pinocitose, no terminal pré-sináptico, ou seja, durante o processo de recaptação, a membrana pré-sináptica envolve o neurotransmissor, deslocando-o de volta para o axónio. O glutamato e o GABA equilibram-se mutuamente num processo de homeostasia neuronal através de processos de inibição-excitação (Lindsay, 2000c).

O glutamato é o neurotransmissor excitatório primário no cérebro e um mediador da plasticidade sináptica, que é necessária para o organismo adaptar comportamentos num ambiente diferente (Abraham, 2008). Tal como referido anteriormente, o glutamato é o neurotransmissor responsável pela indução da LTP e por isso está intimamente ligado com a aprendizagem e com a formação de memórias.

A adição pode ser caracterizada como uma diminuição da capacidade de alterar a resposta comportamental ao alvo da adição. O glutamato tem um papel crucial no desenvolvimento e na expressão dos comportamentos de adição, como a procura e o desejo pelo alvo de adição. O desenvolvimento destes comportamentos requer uma estimulação do receptor de glutamato na área tegmental ventral (VTA) e está associado com o aumento da libertação de glutamato e a uma LTP dependente de glutamato nas células dopaminérgicas. Já a expressão destes comportamentos requer uma libertação de glutamato no centro do *nucleus accumbens* (Kalivas *et al.*, 2009).

O GABA é um transmissor inibidor ubiqüitário no cérebro e é importante ter em conta que os neurónios GABAérgicos podem ser inibidos pela dopamina (Pageat, 2000).

O GABA está relacionado com o controlo de fobias e distúrbios de ansiedade generalizados (Lindsay, 2000c). As benzodiazepinas atuam modificando a ligação do GABA aos seus recetores, levando assim, a uma amplificação da atividade do recetor e a uma inibição da atividade no circuito do medo (Panksepp, 1998). Por isso, cães com medo intenso e com problemas de ansiedade são medicados com benzodiazepinas. No entanto, estas devem ser utilizadas com cuidado, pois a sua utilização pode fazer escalar o nível de agressividade em animais com agressividade por medo.

1.1.3.3. Dopamina

A dopamina (DA) pertence à família das catecolaminas, tal como a norepinefrina (NE) e a epinefrina (EPI). Esta família é composta por um catecol (3,4-diidroxibenzeno) ligado a um grupo amina por uma ponte de etil.

O precursor da DA é a tirosina, um aminoácido maioritariamente obtido pela alimentação, mas que também pode ser sintetizado no fígado através da fenilalanina. Para a síntese de DA ocorre um par de reações que podemos ver na figura 5: oxidação da tirosina em L-DOPA (levodopa ou L-3,4 – dihidroxifenilalanina) pela enzima tirosina hidroxilase (TH) e conversão da L-DOPA em DA pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC). Estas reações ocorrem nos citoplasmas dos neurónios dopaminérgicos. No entanto, nas células que segregam a NE, a DA é convertida em NE pela enzima dopamina β -hidroxilase e, subsequentemente, a NE converte-se em EPI pela feniletanolamina N-metiltransferase.

A velocidade de produção destas aminas é limitada pela enzima TH que oxida a tirosina em L-DOPA, sendo considerada o fator limitante de produção (Standaert & Galanter, 2009).

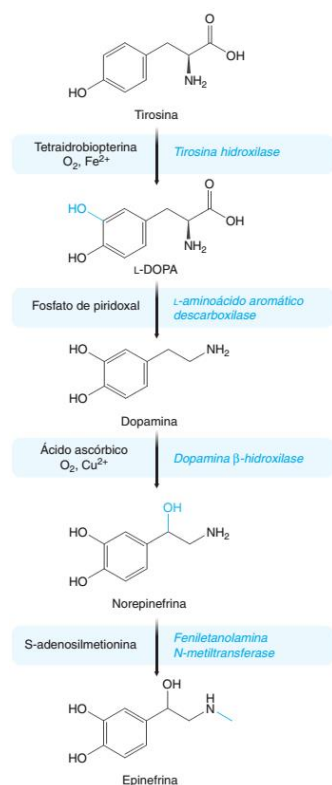


Figura 5 - Síntese das catecolaminas (Standaert & Galanter, 2009)

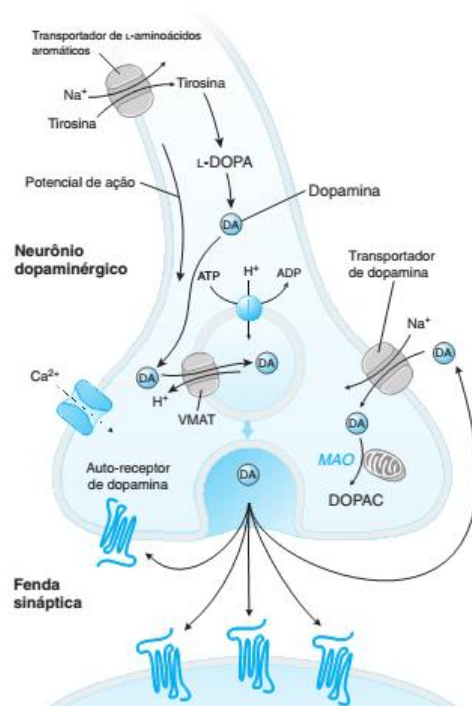


Figura 6 - Neurotransmissão dopaminérgica (Standaert & Galanter, 2009)

Como foi referido no ponto 1.1.3, os neurotransmissores são produzidos no citoplasma e são posteriormente armazenados em vesículas para serem libertados na fenda sináptica. Também a DA sofre este processo. O transporte da DA para a vesícula sináptica é dependente de duas bombas moleculares: A ATPase, que concentra protões na vesícula criando um pH intravesicular baixo e um interior eletropositivo, em conjunto com um transportador de monoaminas vesicular (VMAT), que permite o deslocamento dos protões para fora da vesícula, transportando a DA para o interior da mesma (figura 6).

Quando há um potencial de ação na célula, a vesícula funde-se com a membrana num processo dependente de Ca^{2+} e liberta a DA na fenda sináptica. A recaptação é efetuada através pelo transportador de dopamina (DAT) contra o gradiente de concentração utilizando, por isso, requer uma fonte de energia através do co-transporte de Na^+ . Uma vez de volta à célula pré-sináptica, a DA é armazenada em vesículas pelo VMAT ou degradada pela monoamina oxidase (MAO) (Standaert & Galanter, 2009).

Avançadas técnicas de clonagem molecular permitiram identificar 5 tipos de recetores dopaminérgicos, todos eles acoplados a proteínas G e divididos em duas famílias D1 e D2. A família D1 estimula a formação de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) como principal mecanismo de transdução de sinal entre células. A família D2 inibe essa mesma formação (Bahena-Trujillo, et al., 2000).

A maior parte da DA é produzida e distribuída por três sistemas cerebrais, como se pode ver pela figura 7: i) pelo sistema nigroestriatal, que contém 80% da DA, este sistema envolve neurónios produtores de dopamina na substância negra do mesencéfalo até ao corpo estriado (núcleo caudado e putâmen); ii) pelo sistema mesolímbico, através de células produtoras de dopamina na área tegumentar ventral até regiões do feixe medial do prosencéfalo, incluído a amígdala, *septum* lateral, hipotálamo, hipocampo e núcleo accumbens; pelo sistema mesocortical, que também se origina na VTA com projeções dos axónios para o córtex límbico, córtex pré-frontal e hipocampo. Existe ainda um quarto sistema de comunicação dopaminérgico, este ocorre entre o hipotálamo e a glândula pituitária (Lindsay, 2000c).

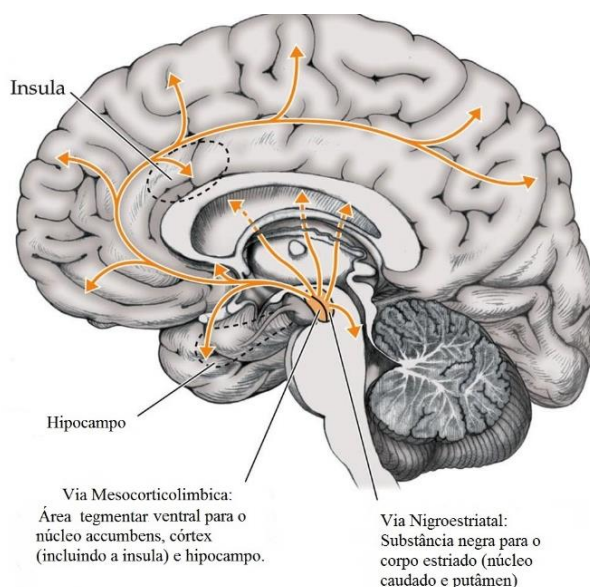


Figura 7 - Via dopaminérgica. (Breedlove, et al., 2010)

Em cães, não foram encontrados valores de referência para a DA. Já em humanos, os valores variam bastante consoante o autor, havendo alguma dificuldade em chegar-se a um valor basal concreto. Algumas referências indicam valores fisiológicos menores que

20 ng/ml para adultos e menores que 60 ng/ml para jovens de idade entre os 3 e os 15 anos (Normal Hormone Reference Ranges, 2011). O Laboratório Joaquim Chaves, laboratório de referência em Portugal, considera um valor fisiológico menor que 94 ng/l.

A nível de função, a DA é um neurotransmissor particularmente importante do sistema nervoso central (SNC), tendo uma função de controlo dos movimentos e da postura. A sua ausência caracteriza a doença de Parkinson em humanos, cuja terapia passa pela administração do precursor da dopamina, a L-dopa (Habib, 2003). Outras funções atribuídas a este neurotransmissor são a emotividade e afetividade, bem como a comunicação neuroendócrina. No sistema nervoso periférico (SNP) a dopamina é um modulador da função cardíaca e renal, do tónus muscular e da motilidade gastrointestinal (Bahena-Trujillo, et al., 2000).

Os circuitos dopaminérgicos estão relacionados com o desenvolvimento de distúrbios comportamentais e cognitivos, como a esquizofrenia em humanos e distúrbios compulsivos em cães. Apresentam também um papel fundamental na aprendizagem associativa, uma vez que experiências de recompensa que resultam do reforço positivo ou negativo, parecem ser dependentes de DA. Ou seja, o reforço resultante de estímulo apetitivo, bem como o reforço resultante da prevenção de um estímulo aversivo, são ambos afetados quando a atividade da DA é bloqueada (Carlson, 2012).

Sabe-se que a DA tem um papel importante na recompensa e na motivação (Domjan, 2003), e estudos recentes evidenciam que a DA está envolvida na determinação da saliência do incentivo (do inglês *saliency of incentives*) mas que não participa na parte hedónica da experiência do prazer (Berridge & Kringelbach, 2013), o que leva a comunidade científica a crer que a teoria do reforço de Schultz será a mais apropriada. Esta teoria enuncia que existe uma alteração nos níveis de dopamina quando há um desencontro entre a recompensa esperada (prevista) e a recebida (Schultz, 1998). Já anteriormente tinha sido descoberto que quando um sinal neutro é emparelhado com uma recompensa desejável, de forma a que o sinal se torne um sinal preditor da recompensa (estímulo incondicionado), DA é libertada quando o sinal preditor é apresentado e não há mais libertação de dopamina quando a recompensa é finalmente oferecida (Hollerman & Schultz, 1998). Mais recentemente Schultz evidenciou que quando é apresentado o sinal preditor, mas não é fornecida a recompensa esperada, cria-se um erro na predição do sinal e os animais experienciam um aumento de DA quando o

sinal é apresentado e, seguidamente uma redução da atividade dopaminérgica abaixo do nível basal (Schultz, 2016).

1.1.3.4. Serotonina

Rapport, Green e Page, em 1948, isolaram e identificaram a serotonina, ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), como sendo a substância libertada pelas plaquetas que fazia aumentar o tónus vascular após um coágulo sanguíneo. Esparmer, (1952) identificou a serotonina nas células enterocromafins no intestino enquanto Twarog and Page (1953) e também a detetou em extratos de massa cerebral.

A serotonina é composta pela combinação de um grupo hidroxilo na posição 5 e uma amina primária que serve como aceitadora de protões, sendo que esta combinação faz com que esta substância seja hidrofílica e por isso não passa a barreira hematoencefálica. A descoberta da sua presença do cérebro em 1953, indicou que haveria síntese de 5-HT no cérebro (Hensler, 2012). Desde essa altura, vários estudos foram realizados e o conhecimento sobre esta amina cresceu exponencialmente.

Hoje sabe-se que os neurónios produtores de serotonina estão localizados nos núcleos da rafe, na medula, com projeções para várias partes do cérebro como o hipotálamo, a amígdala, hipocampo, septum, núcleos da base e córtex cerebral (figura 8). As projeções de fibras serotoninérgicas terminam no sistema límbico, tendo aí um papel muito importante na inibição da raiva e agressividade (Lindsay, 2000c). Sabe-se que a 5-HT tem um papel muito importante na função normal do cérebro, incluindo a modulação do humor, fome, sexo, sono, memória, emoção, ansiedade (Nichols & Nichols, 2008). A nível endócrino a 5-HT tem também um papel modulatório já que participa no controlo hipotalâmico da secreção pituitária, mais concretamente na regulação da adrenocorticotropina (ACTH), prolactina e hormona do crescimento (Hensler, 2012).

Os neurónios serotoninérgicos produzem serotonina através de uma serie de reações com início no triptofano nutricional, como podemos ver na figura 10. Este aminoácido essencial é convertido em 5-hidroxitriptofano através da enzima triptofano hidroxilase (TPH), seguidamente o composto é convertido em 5-hidroxitriptamina, ou serotonina, pela enzima L-aminoácido aromático descarboxilase. A síntese de 5-HT vai ser limitada pela enzima TPH, uma vez que esta enzima é regulada por retroalimentação inibitória através de auto-recetores pré-sinápticos que respondem a aumentos locais de

concentração de 5-HT (Nadal-Vicens et al., 2009). A atividade neuronal também tem um efeito direto na síntese e liberação de serotonina. Os neurónios serotoninérgicos têm a capacidade de sintetizar 5-HT a partir do triptofano como resposta a um conjunto de estímulos elétricos, contribuindo assim para a plasticidade neuronal, como referido anteriormente na página 14 (Boadle-Biber, 1993).

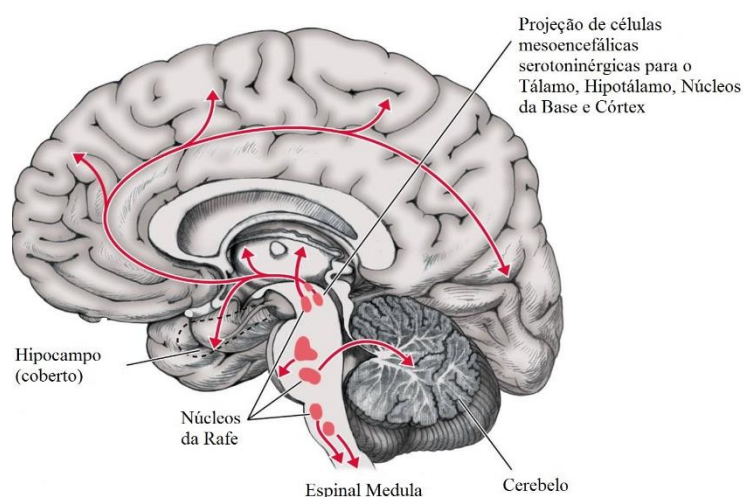


Figura 8 - Via serotoninérgica (Breedlove, et al., 2010)

Como consta na figura 9, a serotonina produzida é transportada pelo VMAT para as vesículas pré-sinápticas no axónio pré-sináptico das células serotoninérgicas, onde fica armazenada. Quando há um potencial de ação, a 5-HT é libertada na fenda sináptica, através de um processo de exocitose dependente de Ca^{2+} , sendo posteriormente recaptada por um transportador seletivo de serotonina (SERT), podendo ser degradada pela MAO ou sequestrada em vesículas sinápticas pelo VMAT (Nadal-Vicens et al., 2009).

A família de recetores serotoninérgicos é bastante grande. Até hoje foram encontradas sete famílias de recetores e catorze subtipos. Com exceção do recetor 5-HT₃, que é um recetor de canal iónico regulado por ligante, todos os outros são recetores acoplados à proteína G (GPCR). Estes recetores podem ser inibitórios ou excitatórios (Nichols & Nichols, 2008).

Os valores normais desta amina variam de espécie para espécie e mesmo entre indivíduos a variabilidade é bastante grande. Em medicina veterinária, apenas há poucos anos se iniciou a medição de serotonina para diagnósticos de doenças comportamentais. Assim os valores fisiológicos de serotonina em cães ainda não estão completamente

definidos. No entanto, em humanos considera-se um valor fisiológico entre os 50 e 200 ng/ml (Chernecky & Berger, 2013).

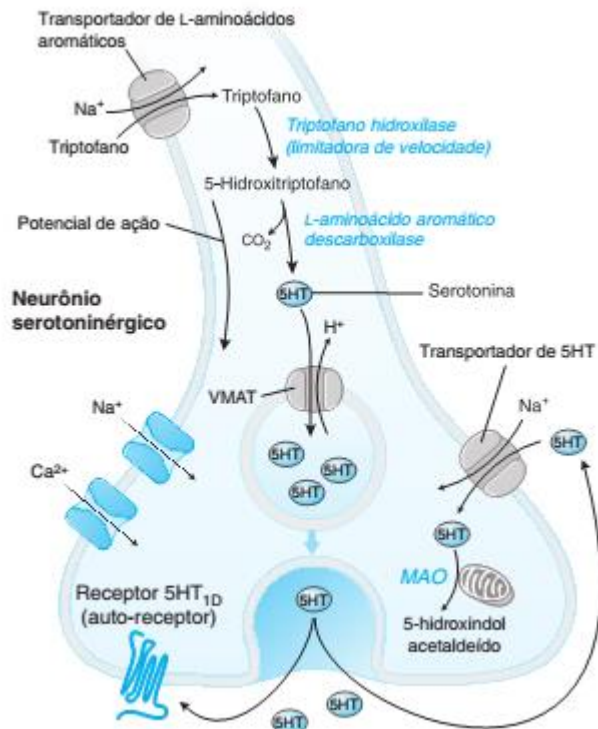


Figura 9 - Regulação pré-sináptica da neurotransmissão da serotonina (Nadal-Vicens, Chyung, & Turner, 2009)

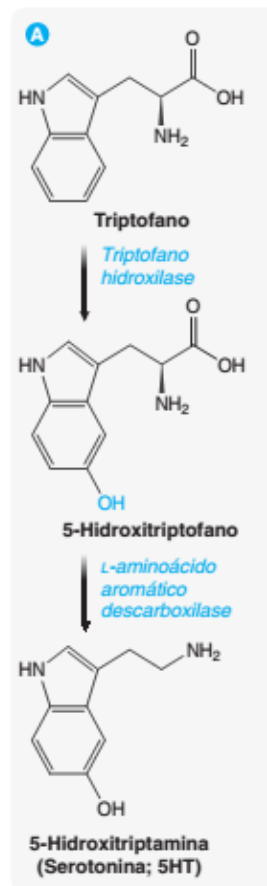


Figura 10 - Síntese de Serotonina a partir do triptofano nutricional (Nadal-Vicens, Chyung, & Turner, 2009)

Importa salientar a correlação existente entre os níveis de serotonina no cérebro e no sangue periférico, nomeadamente nas plaquetas. Tal como os neurónios, as plaquetas captam a serotonina pelo SERT, que a transporta pela membrana celular, sendo posteriormente armazenada em vesículas. Da Prada *et al.* (1988) concluíram que existe correlação entre a serotonina no sangue periférico e os níveis de serotonina nos neurónios. Recentes autores confirmaram que os níveis de serotonina no líquido cefalorraquidiano

(LCR) e nas plaquetas estão fortemente relacionados e que existe também uma correlação entre o LCR e os níveis de serotonina no plasma e na urina, embora essa relação já não seja tão forte (Audhya, Adams, & Johansen, 2012), o que fará todo o sentido, já que 99% da serotonina periférica está contida nas plaquetas (Celada, Martin, & Artigas, 1994).

A ligação entre a serotonina e o comportamento é estreita, porém ainda não se sabem os limites da ação da serotonina na variação dos comportamentos. Sabe-se que indivíduos com níveis baixos de serotonina têm tendências depressivas e suicidas, e que drogas como os inibidores de recaptação de serotonina e inibidores da MAO têm um papel terapêutico neste tipo de situações (Lindsay, 2000c).

Em relação aos comportamentos compulsivos, também foi demonstrada a intervenção da serotonina através de estudos como o de Rapoport em que a clomipramina e fluoxetina (antidepressivos tricíclico e inibidor seletivo da recaptação de serotonina) obtiveram resultados eficazes em 42 cães que apresentavam comportamento compulsivo de lambedura, enquanto outras medicações não foram eficazes (Rapoport, Ryland, & Kriete, 1992). Também a agressividade e os comportamentos impulso-controle aumentam quando os níveis de serotonina diminuem (Seo, Patrick, & Kennealy, 2008).

1.1.3.5 Péptidos Opiáceos

Os péptidos opiáceos, ou opióides, foram descobertos em 1975 graças à demonstração da existência no SNC de recetores para a morfina. A existência de recetores para tal substância indicava que existiam substâncias naturais no organismo que se fixavam seletivamente a esses recetores. Foram posteriormente descobertas as substâncias peptídicas cuja fórmula química se assemelhava à da morfina: as encefalinas e a endorfina. Embora estas substâncias derivem de um precursor comum, a sua ação é exercida em locais diferentes (Habib, 2003).

Funcionalmente, exercem o controlo da dor (em especial a β -endorfina). Embora ainda não seja totalmente conhecido o processo, sabe-se que também estão relacionadas com numerosos mecanismos psicológicos e com comportamentos complexos como a agressividade, sexualidade, prazer e a habituação (Habib, 2003).

1.1. Teoria da Aprendizagem

1.1.1. Condicionamento Clássico

O condicionamento clássico, ou aprendizagem associativa, é um dos maiores mecanismos de aprendizagem em animais e ocorre diariamente (Yin, 2009a). Acontece quando se cria uma relação associativa entre dois ou mais estímulos (Case, 2010). A aprendizagem associativa permite que a flexibilidade comportamental seja melhorada de forma que o animal consiga antecipar a ocorrência de eventos atrativos ou aversivos, como podemos ver nas figuras 11 e 12 (Lindsay, 2000a).

As respostas reflexas são respostas incondicionadas, ou seja, são respostas que não precisam de condicionamento prévio para acontecerem. Estas respostas são induzidas por estímulos incondicionados. Os estímulos neutros são aqueles que não possuem capacidade de criar uma resposta incondicionada. No entanto, através da aprendizagem associativa, em que o estímulo neutro é contíguo ao estímulo incondicionado, estímulo neutro torna-se um estímulo condicionado, com a capacidade de provocar uma ação reflexa designada de resposta condicionada. Ao conjunto do estímulo condicionado e da resposta condicionada chamamos de reflexo condicionado (Lindsay, 2000a).

Embora o condicionamento clássico ocorra naturalmente na aprendizagem animal, este processo só foi descrito pela primeira vez pelo investigador Ivan Pavlov (1927/1960). A sua descoberta deu-se quando Pavlov ao realizar um estudo sobre o sistema digestivo, reparou que os cães começavam a salivar antes da comida entrar na boca deles. Para testar a sua hipótese, Pavlov emparelhou um estímulo auditivo (o som de uma campainha) com a apresentação da comida e depois de algumas repetições, verificou que os cães salivavam ao ouvir a campainha mesmo na ausência de comida (Yin, 2009a).

Neste caso, podemos classificar a comida de estímulo incondicionado e a salivação de resposta incondicionada. Depois de emparelhar um estímulo neutro, a campainha, com o estímulo incondicionado, este torna-se um estímulo condicionado, aquele que é aprendido, e que induz uma resposta condicionada (a salivação na ausência de comida) (Yin, 2009a).

A relação entre o estímulo incondicionado e condicionado é fortalecida quando o estímulo condicionado ocorre consistentemente antes da apresentação do estímulo incondicionado. Essa relação é enfraquecida (extinção) quando os estímulos ocorrem

independentes um do outro (Lindsay, 2000a). Aliás, sabe-se que o condicionamento clássico é mais provável acontecer se os estímulos forem contíguos e contingentes, ou seja, se forem bem emparelhados no tempo e se esse emparelhamento for consistente e confiável (Case, 2010).

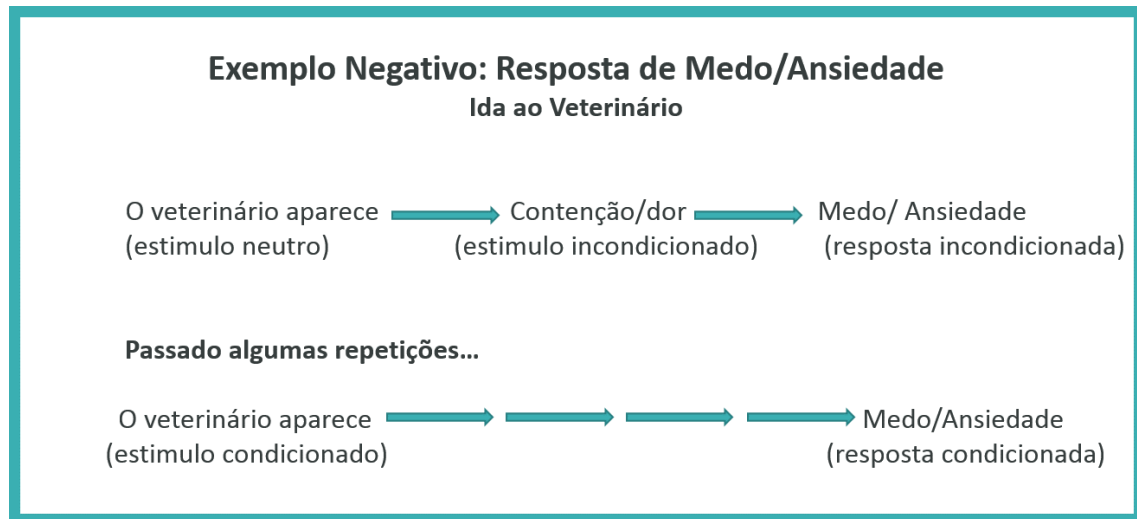


Figura 12 - Exemplo de uma situação de condicionamento clássico negativo. Adaptado de Case, 2010.

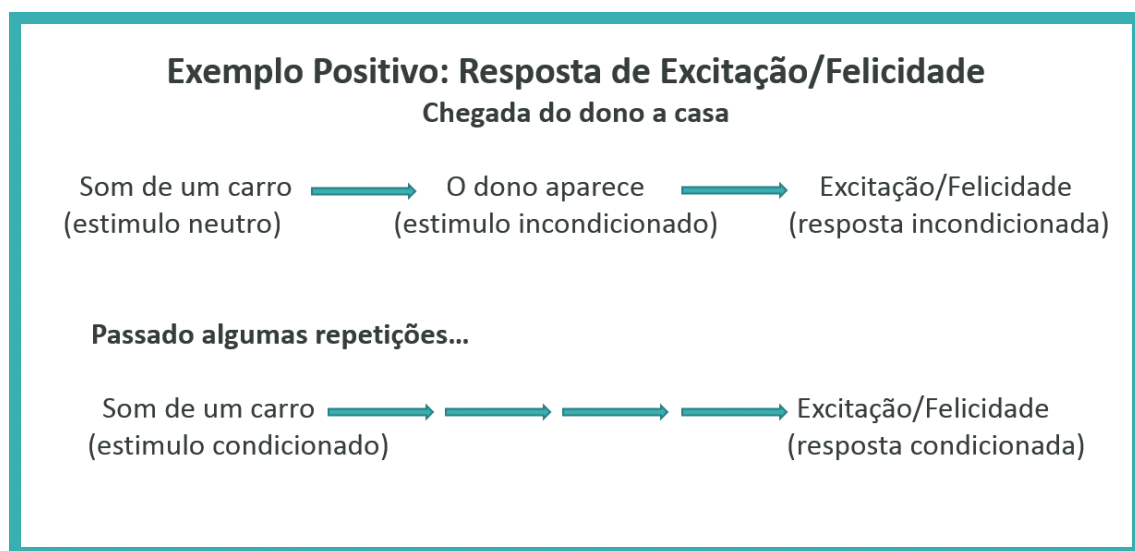


Figura 11 - exemplo de uma situação de condicionamento clássico positivo. Adaptado de Case, 2010.

Pavlov descreve outro fator que influencia o condicionamento clássico, além da proximidade temporal, que é a ordem em que o estímulo neutro ocorre. A relação

temporal ideal entre o estímulo incondicionado e o estímulo neutro é obtida se este for apresentado meio segundo antes do estímulo incondicionado (Lindsay, 2000a).

1.1.2. Condicionamento Operante

Esta terminologia é originada a partir do conceito que os animais estão sempre a operar dentro do seu ambiente, e subsequentemente, alteram o seu comportamento em resposta às consequências que obtêm.

Chama-se condicionamento operante, ou aprendizagem instrumental, à aprendizagem que resulta da consequência do comportamento (Case, 2010). Edward L. Thorndike (1911/1965) foi um dos responsáveis pelo estudo da aprendizagem instrumental através de estudos de tentativa/erro. (Lindsay, 2000b) A partir desses estudos, Thorndike criou a Lei do Efeito, que enuncia que o animal repete os comportamentos que têm consequências desejáveis, comportamentos reforçados, e evita comportamentos que levam a consequências indesejáveis, comportamentos punidos (Yin, 2009b).

O conceito de comportamento operante e o controlo do mesmo, foram amplamente estudados por B.F. Skinner (1938/1966) através da “Caixa de Skinner”. Skinner utilizava ratos ou pombos que eram mantidos nessa caixa e que eram treinados a pressionar uma alavanca (para os ratos) ou a bicar um disco iluminado (para o caso dos pombos) na presença de um estímulo discriminado. Após o comportamento ser efetuado era oferecido comida aos animais. A taxa de resposta dos animais era analisada consoante diferentes variáveis. (Lindsay, 2000b)

Assim, o condicionamento operante envolve primariamente uma relação de resposta-consequência (ação-reação), enquanto o condicionamento clássico apenas estabelece uma relação entre estímulos (Case, 2010).

1.1.2.1 As 4 categorias do condicionamento operante

Existem alguns termos que são importantes nas técnicas de condicionamento operante, esses termos são cruciais para a teoria da aprendizagem como área da psicologia. São eles: O reforço positivo, reforço negativo, punição positiva e punição negativa (Yin, 2009b).

O reforço aumenta a probabilidade de um comportamento acontecer, esse reforço é positivo se a ele adicionarmos algo que o animal quer, e é negativo se o fizermos

removendo algo a que o animal tem aversão (Lindsay, 2001). A punição diminui a probabilidade do comportamento acontecer. A punição é positiva se ao adicionarmos algo aversivo o animal diminui o número de comportamentos, e é negativa se ele diminui o número de comportamentos através da remoção de algo que o animal quer (Yin, 2009b).

É importante saber distinguir entre punição positiva e reforço negativo pois elas podem parecer semelhantes. A utilização do termo “reforço negativo” é muitas vezes mal aplicada, pois existe alguma relutância em utilizar a palavra “punição” por ter uma conotação menos amistosa. Devemos diferenciar os dois termos com base no objetivo do comportamento: se o objetivo é diminuir o número de comportamentos, então o termo certo é punição (Yin, 2009b). As coleiras de choque não são um método que recompensa o cão, pois tem o objetivo inibir certos comportamentos através da adição de uma sensação aversiva, logo são métodos de punição positiva (Perry & Parke, 1975).

Historicamente, o treino canino era baseado no impulso de controlar o comportamento indesejável de um cão. Acreditava-se que era necessário haver correção física e coerção para controlar um cão que não se comportava de forma desejada. E embora alguns estímulos aversivos fossem relativamente inócuos, outros eram abusivos e perigosos. Considerando o seu potencial para o abuso, utilizar a punição positiva como a principal forma de modificar o comportamento de um animal, não é a opção mais inteligente. A sua utilização tem também grandes limitações que muitas vezes não são consideradas. Isto ocorre porque este método é aparentemente eficaz, e obtém resultados rapidamente (Case, 2010). No entanto, a utilização da punição positiva frequentemente causa habituação a estímulos suavemente aversivos, sendo necessário aumentar a intensidade do estímulo aversivo para ser eficaz. Seguidamente, para suprimir um comportamento indesejado será necessário um estímulo tão intenso que irá causar dor, medo, evitação e em alguns casos agressão. Ainda se acrescenta o facto de a punição positiva não providenciar nenhuma informação em relação aos comportamentos alternativos que o cão pode executar para evitar a punição no futuro. A punição positiva é difícil de executar de forma eficaz e esporádica, sendo que a sua utilização repetida irá deteriorar a relação entre o animal e o humano (American Veterinary Society of Animal Behavior, 2008).

A categoria que normalmente funciona melhor na interação animal-homem é o reforço positivo. Assim, em vez de procurarmos parar ou punir um determinado

comportamento, devemos nos focar no reforço de comportamentos alternativos, ou tentar evitar reforçar o comportamento indesejado (Yin, 2009b). Ainda assim, a punição positiva poderá ser utilizada de forma segura, em situações em que é necessário parar um comportamento, como afastar os animais de certos objetos ou áreas. A utilização eficaz e segura depende do momento em que é feita, da consistência, da intensidade e da informação alternativa: i) devemos punir o animal no momento em que o comportamento é realizado, nunca depois deste ter ocorrido; ii) a punição deve ser consistente, ou seja, deve ocorrer sempre que o comportamento é realizado; iii) a intensidade da punição deve ser suficiente para interromper o comportamento mas não deve causar medo; iv) sempre que se pune um animal, deve-se em seguida indicar um comportamento alternativo, e esse comportamento deve ser reforçado. É vantajoso condicionar a palavra “Não” ou “Errado” quando a punição é realizada, desta forma permite-nos no futuro utilizar apenas a palavra para indicar ao animal que aquele comportamento não é aceitável (Case, 2010).

1.1.3. O Reforço

É importante compreender como funciona o reforço e como ele se manifesta a nível celular para a modificação comportamental. Os comportamentos são melhor aprendidos se cada vez que eles ocorrem, forem reforçados. A nível celular, a repetição do reforço assegura uma melhor, mais numerosa e mais eficaz conexão entre os neurónios (Wittenberg & Tsien, 2002).

Existem três componentes neuronais para o reforço: querer, gostar e prever. O *querer* é referido como o componente motivacional ou a saliência de incentivo. O *gostar* é a componente hedonística e o *prever* é a componente cognitiva associada à predição ou sinal preditor. Uma pesquisa em ratos sobre o circuito do reforço mostrou que fármacos que estimulam as vias dopaminérgicas apenas aumentam a componente de motivação/incentivo da recompensa, deixando a previsão, que é aprendida, e a componente “gostar” ou a componente hedonista inalterada (Smith, Berridge, & Aldridge, 2011).

O conceito de motivação (componente *querer*) é frequentemente considerado, mas raramente medido ou definido, mas é um componente importante para a modificação comportamental através da aprendizagem (Overall, 2013b). Todas as espécies são motivadas por 3 reforços inatos: alimento, a necessidade de evitar dor e perigo, e a

necessidade de se reproduzir. Para propósitos de treino, a necessidade reprodutiva não é adequada e o uso de técnicas aversivas geram, na sua maioria, medo. Sendo assim, o alimento é o melhor motivador para o treino. A acrescentar a estes três motivadores existem outros fatores que motivam as diferentes espécies. Os animais predadores, como o cão, são também motivados pelos comportamentos predatórios e, por isso, é comum gostarem de correr atrás de objetos ou de apanhar e morder brinquedos, em especial os que têm som (Yin, 2009b).

A força de um determinado reforço é dinâmica e muda de acordo com o estado do animal e com fatores ambientais. Sabendo isto, é possível alterar a força de um reforço ao controlar o ambiente do animal. Por exemplo, se o reforço for alimento, será lógico esperar que animal tenha fome, de forma que fique mais motivado (maior força de reforço). Outro aspeto importante prende-se com o uso apropriado do motivador. Consoante o contexto, para alguns animais é inútil reforçá-los na rua com carícias, mas em casa, poderá ser um tipo de reforço válido (Yin, 2009b).

O reforço é definido pelo efeito no sujeito e não pelo seu conteúdo, sendo que o sujeito (o cão ou o gato) determinam se um estímulo particular é desejável ou aversivo. Assim, dependendo do animal e do ambiente onde este se encontra, certo estímulo pode ser prazeroso e por isso reforçar um comportamento, ou pode ser aversivo e punir o mesmo comportamento. Note-se que um reforço é algo que reforça o comportamento, ou seja, causa o aumento da sua frequência. Se não a frequência desse comportamento não aumentar em resposta, então a consequência não é um reforço para o animal naquela situação (Case, 2010).

Os estímulos positivos e negativos, que são usados para reforçar ou punir comportamentos, são classificados como reforços primários (incondicionados) ou secundários (condicionados). O reforço primário é um estímulo que tem uma base biológica e que por isso não necessita de condicionamento (aprendizagem) para ser efetivo. Os reforços primários positivos (desejáveis) para um cão bem sociabilizado são comida, oportunidades de interação social, e oportunidades para brincar e se exercitar. Os estímulos primários aversivos para um cão são dor, desconforto, ansiedade ou medo.

Os reforços secundários são estímulos que são completamente neutros ou têm uma fraca capacidade de reforçar, quer positiva, quer negativamente. Estes estímulos estão

condicionados a um estímulo de reforço primário e por isso, depois de condicionados, têm o mesmo poder que o reforço primário (Case, 2010).

Para se conseguir aplicar com sucesso os princípios do condicionamento operante, em particular o reforço positivo, é importante dominarmos o tempo correto de recompensa, o critério para recompensar e número de vezes que o fazemos. O reforço ou a punição deve ocorrer quando o comportamento ocorre, num intervalo de tempo não maior a um segundo.

O critério de recompensa deve ser estabelecido anteriormente ao início da sessão de treino, para o reforço ser claro e consistente. Esse critério deve ser tão evidente para o treinador, que ele consiga descrever exatamente o que pretende do animal a outra pessoa. Embora no treino com cães seja possível mantê-los perto do treinador usando uma trela, é necessário manter a sua atenção através do reforço. Assim, a taxa de reforço (número de vezes que reforçamos o animal) deve ser alta, em especial no início do processo de aprendizagem. Chamamos taxa de reforço contínua quando reforçamos o cão sempre que ele oferece o comportamento pretendido. Esta taxa é mantida até o cão apreender o comportamento. No entanto, o comportamento pretendido deve ser simples, para que o cão o realize repetidamente numa sucessão rápida. Se o comportamento for demasiado complexo, o animal poderá ter dificuldades em perceber o que lhe é pedido, resultando em desinteresse ou frustração. Se for escolhido um comportamento possível de ser realizado numa sucessão rápida, então cria-se o que se chama *behavioral momentum*, tornando o comportamento menos resistente à mudança (Yin, 2009b).

Quando o animal fica familiarizado com o comportamento ou o exercício pedido (80% de respostas certas), devemos mudar a taxa de reforço continua para uma taxa variável de reforço ou podemos aumentar a dificuldade do exercício. Com a taxa variável de reforço (TVR) o cão não sabe quando é que será recompensado. Podemos recompensar, em média, a cada duas vezes (Taxa variável de 2: TRV2) ou a cada 3 vezes (TRV3), aumentando esta relação consoante o nível de treino em que o animal se encontra. No entanto, a TRV é uma média e devemos, por vezes, surpreender o cão recompensando-o noutros momentos. Recompensar exatamente a cada \times vez (taxa fixa de reforço), pode levar a que o cão se torne preguiçoso nos primeiros comportamentos e melhore nos últimos (Yin, 2009b).

1.1.4. Comunicação

Vários fatores influenciam a comunicação entre o homem e o cão. Um deles é o tempo e a falha temporal na recompensa do animal que pode levar a que o animal não compreenda o que é pedido. Outros fatores são a linguagem corporal e as pistas verbais. No entanto, a linguagem corporal (pistas visuais) precede as pistas verbais. Pois quando são facultadas em simultâneo, sinalizando comportamentos diferentes, os cães seguem mais frequentemente as pistas visuais (Mills, 2005). Este facto também pode indicar que, quando trabalhamos com os cães, eles podem estar a ler sinais que nós não nos apercebemos de estar a emitir. Assim, podemos confundir o animal sem nos apercebermos de o estarmos a fazer.

Nos treinos em que se pretende ensinar um comportamento através de uma pista visual e verbal simultaneamente, o cão irá aprender com mais facilidade aquela que o treinador destacar no ambiente – *overshadowing* (Yin, 2004). A maneira mais fácil de ensinar sinais verbais, é treinando inicialmente um gesto (pista visual) e seguidamente associar a pista verbal oferecendo-a imediatamente a seguir à pista visual (Yin, 2009b). Outra situação que pode confundir o cão em relação às pistas verbais é a diferença de entoação com que é pronunciada. Fukuzawa *et al.* (2005) conclui que os cães não efetuaram os comportamentos desejados quando as palavras usadas foram semelhantes às que lhes são ensinadas, indicando que pequenas alterações na palavra são perceptíveis pelos animais. Os animais podem responder a comandos feitos por uma determinada pessoa e não responder a outra, mesmo quando ela usa a mesma palavra.

Há ainda o fator emocional das pistas verbais, que pode diferir consoante o estado emocional do treinador. Deve-se tentar transmitir um tom positivo, pois os cães respondem melhor com um tom alegre do que com um tom agressivo ou sombrio (Mills, 2005).

1.1.5. Condicionamento Clássico vs. Condicionamento Operante

A capacidade de aprender pela experiência é um fator imprescindível para garantir o sucesso da aprendizagem. Através da combinação eficaz entre os processos de aprendizagem clássicos e instrumentais, os cães conseguem prever e controlar as ocorrências de eventos biológicos significativos. Enquanto o condicionamento clássico oferece ao cão informação sobre evento, o condicionamento operante serve para otimizar o controlo do cão sobre o mesmo evento, ou seja, as aprendizagem clássica e instrumental

conjugadas, oferecem ao cão uma interface fluida e adaptativa entre o animal e o ambiente (Lindsay, 2000b).

O condicionamento clássico difere do condicionamento operante; enquanto o primeiro *provoca (Elicit)* pois o comportamento reflexivo ou responsivo é provocado por um estímulo apropriado para o acontecimento, o segundo *emite (Emit)*, visto que o comportamento operante é emitido sem a presença ou a necessidade de um estímulo elícito. O comportamento reflexivo é natural e involuntário, enquanto a aprendizagem instrumental desenvolve comportamentos por objetivos e estes operam ativamente no ambiente externo para produzir consequências agradáveis (Lindsay, 2000b). O condicionamento clássico envolve um estímulo condicionado e incondicionado e as consequentes várias respostas provocadas por eles. No caso da aprendizagem instrumental, a força da resposta depende, acima de tudo, da presença de uma relação estabelecida entre a resposta comportamental e o reforço regular que se segue. (Lindsay, 2000b; Overall, 2013b). Em relação à função, o condicionamento clássico tem como função principal a formação de representações preditivas confiáveis sobre a ocorrência ou não ocorrência de acontecimentos benéficos ou perigosos. O condicionamento operante oferece ao animal informação sobre a forma como esses eventos podem ser controlados através do comportamento, envolvendo a aproximação, a fuga ou o ato de evitar (Lindsay, 2000b).

O condicionamento clássico e o operante são muitas vezes discutidos separadamente, mas na realidade os dois tipos de aprendizagem estão intrinsecamente ligados. Pois um animal aprende a conexão entre dois estímulos através de condicionamento clássico, mas oferece um comportamento de acordo com essa conexão. E esse comportamento é aprendido por condicionamento operante (Case, 2010).

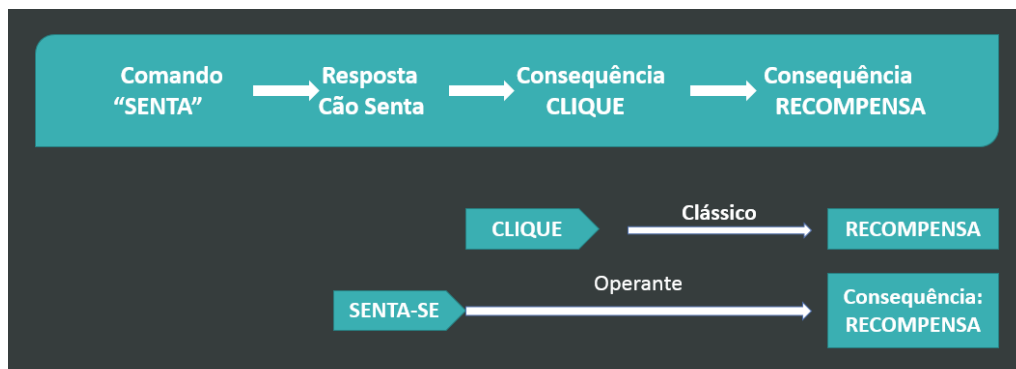


Figura 13 - Relação entre o Condicionamento Clássico e o Operante no Treino Canino. Adaptado de Case, 2010.

Tanto o condicionamento clássico como o operante existem na maioria dos exercícios de treino canino. Um exemplo disso é a utilização do treino com *clicker*, onde a associação do som do *clicker* com a recompensa é feita por condicionamento clássico. A consequência para oferecer um comportamento, por exemplo, o de sentar, é uma recompensa (reforço positivo). Ou seja, se o comportamento de sentar aumentar a frequência, significa que a aprendizagem foi do tipo operante. Finalmente, quando o comando vocal (ou gestual) é adicionado, a relação entre o som ou gesto e a apresentação da recompensa é feita de forma clássica (figura 13) (Case, 2010).

2. Treino com Marcadores

Segundo Frawley (2009), o treino com marcadores é o sistema mais eficaz para treinar um cão. É um método que providencia uma comunicação concreta e baseada no reforço positivo. Este método oferece ao treinador um sistema motivacional para comunicar ao cão, no exato momento, quais são os comportamentos desejáveis. Outra vantagem é a possibilidade de ser utilizado com cães de 8 semanas bem como com cães agressivos de 8 anos, pois é um método não confrontacional.

O treino de marcadores é um treino baseado em condicionamento operante. Este tipo de treino valoriza/marca determinados comportamentos com uma recompensa de alto valor para o cão, seja comida ou um brinquedo, e despreza outros comportamentos que não sejam os pedidos, associando-os à ausência de recompensa. Para o cão associar a recompensa ao comportamento, o tempo entre eles, deve ser menor que um segundo. É esta limitação temporal que é difícil de ser ultrapassada sem o marcador. O marcador é uma ponte entre o comportamento e a recompensa, e permite ganhar tempo sem perder a associação comportamento-recompensa. Essa ponte pode ser qualquer coisa, como uma palavra, um som ou uma luz, desde que seja consistente, que ocorra no intervalo de tempo de menos de um segundo depois do comportamento ser apresentado e ainda que seja sempre seguido de uma recompensa (Frawley, 2009). Qualquer animal tem tendência a repetir ações que tenham um resultado favorável. Assim, facultando as consequências desejáveis para o animal, este realizará as ações pedidas pelo treinador de livre vontade (Pryor, 2005).

Com este método, os animais manifestam um determinado comportamento de forma consciente, e não por hábito. Os cães treinados por condicionamento operante tentam aprender comportamentos novos e lembram-se de comportamentos durante anos porque os aprenderam de uma forma consciente. Os cães desenvolvem confiança porque têm controlo sobre as consequências das suas ações e são entusiastas porque esperam que as consequências sejam prazerosas (Pryor, 2005).

Qualquer comportamento pode ser treinado se for seguida uma simples sequência: conseguir o comportamento, marcar o comportamento e reforçar o comportamento. Só depois do comportamento pretendido ter sido entendido e bem efetuado pelo cão é que se introduz o comando específico. Esse comando pode ser verbal ou gestual. Para introduzir o comando, este deve ser realizado antes do animal repetir o comportamento. Após algumas repetições, a recompensa só deve ser dada se o animal realizar o comportamento quando se o comando tiver sido efetuado. Se o animal não seguir o comando, poderão ter ocorrido erros de associação. É importante saber se o animal entende o comando, se entende o comando fora do ambiente em que o aprendeu e se a recompensa tem um valor suficiente para o cão. Normalmente, se o animal entende o comando e deseja a recompensa, o comportamento será realizado (Pryor, 2005).

O mais utilizado em treino de cães são os marcadores vocais e o marcador por clicker (Frawley, 2009).

2.1. Marcadores vocais

O treino com marcadores vocais utiliza palavras-chaves que são associadas por condicionamento clássico. Frawley (2009) descreve um método de cinco palavras para uma sessão de treino, sendo elas: “Pronto”, “Sim”, “Boa”, “Não” e “Acabou/Pausa”. Obviamente que as palavras condicionadas poderão ser diferentes, desde que sejam consistentes. A palavra “Pronto” é uma palavra que indica o início da sessão de treino. Ela deve ser utilizada quando as condições para se iniciar o treino estão reunidas. A motivação do cão é um fator importante e se ele não estiver motivado para iniciar os exercícios então não deve ser forçado. A palavra “Sim” é utilizada como um marcador positivo. Marca o comportamento no tempo, indicando o exato momento em que o cão agiu de forma correta. Deve ser sempre associada a uma recompensa, ou seja, para cada “sim” existe uma recompensa. Além de marcar no tempo o comportamento certo, também

indica ao cão que ele pode parar o comportamento e interagir com o treinador. A palavra “Boa” é utilizada para prolongar o comportamento no tempo. Aumenta a duração do comportamento, por exemplo, num exercício em que se requer ao animal para ficar deitado, deve-se usar uma palavra que indique ao cão que ele está a realizar o comportamento correto, mas que não indique o fim do exercício. Para esta palavra ser condicionada, devemos primeiro utilizá-la imediatamente ao “Sim” e só progressivamente aumentar o tempo entre elas. A palavra “Não” é um marcador negativo. Indica ao animal que aquele comportamento não é o desejado e que ele não irá receber uma recompensa. Não é uma correção, é apenas uma forma de comunicação. E finalmente a palavra “acabou/pausa” significa o fim da sessão de treino, e a comida e os brinquedos devem ser guardados. (Frawley, 2009)

2.2. Treino com *Clicker*

Clicker deriva do inglês, e pode ser traduzido como “aquele que clica”. O treino com *clicker* é um método treino por marcadores que utiliza um som característico para marcar um momento, correspondendo ao “sim” do método de marcadores vocais. Antigamente, o *clicker* era um brinquedo de crianças que emitia um som metálico quando pressionado. Este objeto é hoje utilizado como uma ferramenta de apoio ao treino canino, foi modernizado e existem de várias formas, feitos de diferentes materiais e emitem sons mais ou menos intensos (Fields-Babineau, 2006).

O *clicker* não precisa de estar em contacto com o cão, nem de ser visível para funcionar. A maneira mais eficaz de utilizá-lo é atrás das costas ou dentro de um bolso, pois um som abafado é melhor aceite que um clique muito alto e agudo. Alguns cães mais tímidos ou mais sensíveis podem assustar-se com o som e interromper o processo de aprendizagem. O *clicker* é uma forma de comunicação com o cão, pois permite informar o animal que ele teve um comportamento desejável. Atua como uma ponte entre o comportamento e a recompensa e por isso permite relacionar a resposta e a consequência de uma forma rápida e distinta. Através de condicionamento clássico, o cão aprende que o som do *clicker* está associado a uma recompensa. Essa recompensa pode ser comida, um brinquedo, um toque ou qualquer outra coisa que faça ao comportamento aumentar de frequência (Fields-Babineau, 2006).

2.3. Diferenças entre os marcadores de voz e o *clicker*

O *clicker* é mais eficaz que a voz porque a voz está permanentemente a ser utilizada. Embora a voz seja uma forma eficaz de comunicação pois utiliza vários tons e palavras específicas, não oferece um som distinto para reforçar uma boa resposta, pois é um som constante na vida do cão (Fields-Babineau, 2006).

Outro aspeto que privilegia o uso do *clicker* é o tempo que decorre entre o comportamento e o som. O *clicker* é mais rápido, é um som mais curto e permite identificar o exato momento que queremos recompensar, marcando de forma mais assertiva o comportamento desejado. A voz nem sempre permite recompensar no tempo exato e é mais difícil expressar contentamento num tom de voz apropriado do que simplesmente pressionar o *clicker*.

É de salientar que o som do *clicker* oferece uma resposta não emocional e, independentemente do estado do humano, o cão recebe uma recompensa-ponte consistente, aumentando a confiança (Fields-Babineau, 2006).

2.4. Neurobioquímica dos marcadores de treino

O treino com marcadores ganhou nos últimos anos uma enorme popularidade. A sua eficácia versatilidade permitiram aplicar este método no treino dos mais variados animais, de forma rápida e sem recorrer à força ou a métodos aversivos. No entanto, na opinião de Sarah Whitehead, a aplicação deste método está sub-explorada. Para além do treino básico, o treino com marcadores, e especialmente com *clicker*, tem sido utilizado no tratamento e prevenção de doenças comportamentais de animais em cativeiro. Em alguns locais, este método tem revolucionado a rotina e reduzido o uso de sedativos e anestésicos (Whitehead, 2011).

O som do *clicker* é utilizado como um sinal de que o animal fez algo bem e esse facto tem uma maior vantagem do que apenas usar comida como recompensa. Por isso, o treino com *clicker* tornou-se um método que, não só altera problemas comportamentais, como também altera o estado emocional que os sustenta. Existem evidências que suportam a hipótese que não é a recompensa em si que causa a mudança neuroquímica e consequentemente emocional, mas a antecipação da recompensa (Whitehead, 2011). Num estudo realizado em macacos foi revelado que a os níveis de dopamina aumentam com a antecipação da recompensa, e não com a recompensa em si. Concluiu-se ainda que

se a predictibilidade da recompensa diminuísse numa taxa de recompensa variável, os valores de dopamina aumentavam (Sapolsky, 2005).

Outros autores teorizam sobre a possibilidade de o estímulo criado pelo som do *clicker* ter uma via alternativa de processamento neuronal. Essa via será através da amígdala, estabelecendo uma resposta rápida, de retenção a longo prazo e associada a várias emoções positivas, explicando o porquê de uma aprendizagem mais rápida quando comparada com um marcador vocal (Pryor, 2009). Esta autora apoia esta sua teoria em alguns estudos sobre as respostas de medo condicionada em humanos. De forma semelhante do que acontece com as respostas de medo condicionadas em humanos, o estímulo provocado pelo som do clicker cria um padrão de resposta de aprendizagem rápida de retenção a longo termo, muitas vezes apenas com uma experiência e também associada a um grande surto de emoções concomitantes (Phillips & LeDoux, 1992).

2.5. Técnicas de Treino

Prompting

O termo *Prompting* deriva do inglês e significa incitar. Quando utilizado em treino canino, pode-se definir *prompting* como “um estímulo que guia e facilita uma resposta” (Kazdin, 2013). Essa ajuda ocorre antes da resposta ser efetuada e tem o objetivo de facilitar a performance do animal. Quando o incentivo que é oferecido ao animal e resulta numa resposta correta, essa resposta deve ser reforçada. Em certos comportamentos, sem o certo incentivo, o comportamento nunca ocorreria, ou iria ocorrer numa frequência diminuída. Incitar o animal, com instruções ou com gestos, ajuda a gerar uma resposta adequada (Lindsay, 2000b).

O *prompting* está dividido em duas categorias: a física e a gestual. O incentivo físico consiste em manipular fisicamente o animal até o comportamento desejado ocorrer. Considera-se manipulação física a aplicação de pressão manual no dorso do animal, como a utilização de uma parede para que o animal ande junto ao treinador. O incentivo gestual consiste em guiar o cão, sem lhe tocar (Lindsay, 2000b).

Os incentivos físicos facilmente se tornam incentivos gestuais, depois de um processo gradual o incentivo físico desvanece-se. Este processo é ajudado por uma técnica de *showding* (criar uma sombra), que consiste em realizar o gesto de incentivo físico, mas

sem tocar no cão, e eventualmente o incentivo físico torna-se um incentivo gestual (Lindsay, 2000b).

Uma técnica conhecida de *prompting* é o *luring*. Este termo significa atrair e tem o objetivo de fazer o animal seguir a mão, onde temos algo que o cão aprecie, como comida ou um brinquedo. É uma técnica de incentivo gestual e, tal como as técnicas de incentivo gestual, com as repetições é possível gradualmente diminuir o gesto de forma a criar um sinal de comando (Lindsay, 2000b).

Targeting

Targeting significa criar um alvo. O objetivo desta técnica é ensinar o cão a focar-se num determinado local. Poderá ser um objeto, como um *target stick*, uma bola ou um tapete, ou uma parte do corpo como a mão ou o joelho. Embora esta técnica não seja uma verdadeira técnica de modificação comportamental, quando utilizada, é possível criar uma ferramenta de apoio ao treino, ajudando a conseguir o comportamento através de tentativa-erro (Overall, 2013b).

Shaping

Shaping significa moldar. Em treino canino a técnica de *shaping* consiste em moldar o comportamento do animal até atingirmos o comportamento alvo. Ou seja, como não se espera atingir o objetivo em apenas uma fase, deve-se iniciar com o comportamento mais parecido ao que pretendemos e ir moldando através da adição de pequenos comportamentos até chegarmos ao objetivo final (Yin, 2009b).

O primeiro passo desta técnica é criar um estímulo condicionado ao marcador. O animal tem que entender que a apresentação de um determinado comportamento é contingente ao estímulo e que a sua ocorrência está ligada a uma recompensa. Seguidamente deve-se definir qual o comportamento-alvo, desenhar o plano de treino de forma a conseguir definir o que se espera do animal em cada momento e finalmente, quando o comportamento for conseguido e percebido pelo animal, deve-se adicionar um comando para o comportamento (Lindsay, 2000b).

Quando este método falha, deve-se a um destes erros: i) avançar para o passo seguinte quando o animal ainda não compreendeu o passo anterior, ii) saltar passos, iii) ficar no mesmo passo muito tempo. Para seguirmos para o passo seguinte devemos esperar 80-

100% de respostas certas, ou conseguir 5 a 10 respostas corretas seguidas. Este número deve ser adaptado para cada animal. Se o animal conseguir executar a primeira etapa com sucesso e a segunda for executada de forma medíocre então deveremos colocar mais etapas no meio dessas duas. Depois do animal compreender e dominar o exercício, não devemos recompensá-lo sistematicamente. Devemos recompensá-lo apenas quando aumentamos a dificuldade do exercício ou quando realizamos o exercício numa zona com muitas distrações (Yin, 2009b).

Capturing

Capturar o comportamento, significa esperar que o animal ofereça o comportamento desejado e seguidamente reforça-lo sempre que esse comportamento ocorra. (Santos, 2009)

COMPONENTE EXPERIMENTAL

VII. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste estudo são verificar se o treino com marcadores afeta a neurobioquímica cerebral do cão e quantificar a alteração neuroquímica que ocorre face ao treino com marcadores.

Verificação de hipóteses

H0 – Hipótese nula

H1 – As médias dos valores de serotonina dos grupos C e M são diferentes.

H2 – As médias dos valores de dopamina dos grupos C e M são diferentes.

VIII. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Tipo de estudo

Este estudo é exploratório, do tipo observacional e de carácter analítico, com testagem de hipóteses e transversal.

2. Critérios de Seleção

Os critérios de inclusão foram os seguintes: cães adultos, saudáveis, com condição corporal normal, sem nenhuma doença crónica ou aguda e que não tomem medicação. Mentalmente sem doença do comportamento (agressividade desadequada, fobias, comportamentos compulsivos), exibindo um comportamento natural de um cão. Foram excluídos do estudo animais que estivessem permanentemente em canis, sem acesso a interação social ou sem acesso a atividade física normal. Cães punidos fisicamente pelos tutores também foram excluídos do estudo.

Foram selecionados dez cães que correspondiam aos critérios de seleção. Desses dez cães, sete eram fêmeas, das quais três eram esterilizadas, e três eram machos esterilizados. Em relação à idade, esta estava compreendida entre um ano e oito anos, sendo a média das idades 3 anos e 5 meses, e a mediana 3 anos. A condição corporal de todos os animais era considerada saudável, variando entre dois e três, numa escala de cinco. Em relação às raças, consideraram-se cinco cães sem raça definida e cinco foram considerados de raça pura (Border Collie, Setter Inglês, Cocker Spaniel, American Pit Bull Terrier

Os animais treinados surgiram através do contacto com várias escolas de treino da área metropolitana de Lisboa e os animais não treinados são animais que pertencem a alunos do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade de Évora.

3. Delineamento experimental

Atendendo ao objetivo do estudo, foi elaborado um plano experimental com onde foram definidos os seguintes objetivos específicos: i) definir um valor padrão para a serotonina, ii) definir um valor padrão para a dopamina, iii) medir os neurotransmissores em animais não treinados e em animais treinados com marcadores de treino, iv)

estabelecer uma relação estatística entre os valores dos neurotransmissores e a variável treino.

Para identificar os efeitos dos processos de treino com marcador foram constituídos dois grupos, constituídos por 5 cães cada um, cujas características são apresentadas no quadro 1.

Grupo	Número de Cães	Características
C	5	Cães sem contacto com técnicas de treino consistente.
M	5	Cães que tinham contacto com treino com marcadores há pelo menos 6 meses

QUADRO 1 – COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS C E M

Os animais do grupo M pertenciam a treinadores experientes e com vasto conhecimento em treino com marcadores. No entanto, como a qualidade do treino é um facto importante, foi verificado visualmente a qualidade da resposta que o cão oferecia. Para o grupo M as características do treino estão representadas no quadro 2.

Poderá ser consultada a folha de autorização e questionário feito antes da recolha em no anexo 1.

Características de Grupo M
<ol style="list-style-type: none"> 1. Identificar o clicker como som de libertação 2. Procurar a recompensa quando o clicker era acionado 3. Velocidade de resposta 4. Possuir treino básico de obediência: deitar, sentar, andar junto com e sem trela, ficar quieto/imobilizado, regressar ao dono (chamamento), olhar para o dono e acalmar. 5. Possuir algum tipo de treino avançado: Treino de Agilidade grau III, Treino de Obediência Avançada, Treino como cão de terapia.

QUADRO 2 - CARACTERÍSTICAS DE TREINO DO GRUPO

4. Recolha de dados

Os dados foram recolhidos no domicílio do tutor ou no local habitual de treino do cão para que os níveis de ansiedade fossem reduzidos ao mínimo. Os dados recolhidos foram a identificação do animal, características de treino (quando aplicável), avaliação do comportamento, frequências cardíaca e respiratória e amostra sanguínea, sendo a ordem de registo dos dados a mesma referida acima.

As frequências cardíaca e respiratória foram medidas antes da recolha de sangue e apenas no primeiro dia de recolha, tendo sido realizada também uma observação da resposta comportamental e classificada consoante a legenda do quadro 3.

As amostras sanguíneas foram feitas através da colheita de três mililitros de sangue, pela veia cefálica para um tubo de bioquímica (tubo seco) cedido pelo Laboratório Joaquim Chaves. A cada cão foram retiradas três amostras sanguíneas, uma por cada dia, e de forma a respeitar o ritmo circadiano, estas foram retiradas ao entardecer, entre as 17h00 e 19h00. Esta recolha decorreu entre Janeiro de 2017 e Maio de 2017.

Após a recolha, as amostras foram transportadas em transportadoras térmicas, imediatamente centrifugadas a 3500 rotações por minuto, durante 15 minutos. Foram protegidas da luz com papel de alumínio e congeladas. Posteriormente foram enviadas nas mesmas condições para o Laboratório Joaquim Chaves onde foi doseado a serotonina e dopamina plasmática por cromatografia líquida de alta eficiência.

A contenção física foi reduzida ao mínimo, sendo por isso importante a escolha da veia cefálica como local de recolha.

Todos os tutores foram informados do objetivo do estudo bem como dos procedimentos efetuados. Foi cedida autorização por escrito para a obtenção das amostras sanguíneas.

5. Análise Estatística

O tipo de amostragem é não-probabilística, por conveniência, visto que os indivíduos foram selecionados perante um conjunto de critérios específicos. Este tipo de amostragem não poderá ser generalizado para a população geral. Este projeto pretende extrapolar resultados para cães treinados com marcadores de treino, como *clicker*.

Os dados foram tratados no programa estatístico SPSS 17.0 através de teste paramétricos, visto que a amostra cumpria os pressupostos de normalidade e

homogeneidade de variâncias. Os pressupostos de normalidade foram verificados através de um teste Shapiro-Wilk e para o teste de homogeneidade de variâncias foi utilizado o teste de Levene. Para testar as hipóteses em relação às variáveis Serotonina e Dopamina utilizou-se um Modelo Nested com o animal dentro do grupo de tratamento. Para a variável FC utilizou-se um teste de Mann-Whitney U. Para todos os testes foi assumido um nível de confiança de 95%.

Classificação	Ausentes	Ligeiro	Moderado	Elevado
Sinais de Calma	Sem sinais de calma	Olhar para o lado; Lamber o lábio Bocejar	Sinais ligeiros; Arfar;	Sinais Moderados; Mostrar os dentes, Rosnar
Contenção	Sem contenção	Ligeira: tenta retirar a pata.	Ligeira: tenta retirar a pata.	Forte: debate-se
Dificuldade de colheita	Recolha efetuada na primeira tentativa	Recolha efetuada na segunda tentativa	Recolha efetuada na terceira tentativa	Recolha efetuada na quarta ou mais tentativas

QUADRO 3 - CLASSIFICAÇÃO DA RESPOSTA COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS

IX. RESULTADOS

1. Caracterização da Amostra

Nos gráficos seguintes poderá verificar-se as características dos grupos em relação à idade (gráfico 1), relativamente à distribuição de machos, fêmeas, esterilizados e não esterilizados (gráfico 2), bem como as raças da população amostral (gráfico 3).

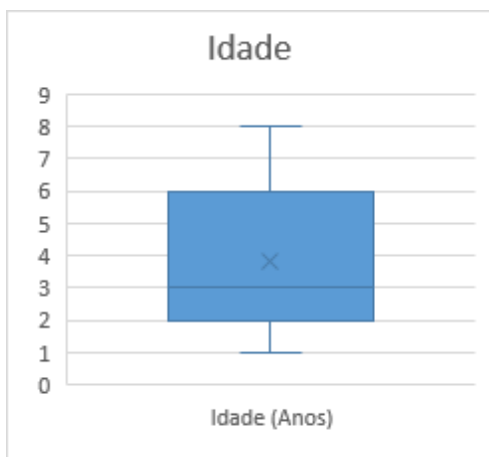


GRÁFICO 1- CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA QUANDO Á IDADE.

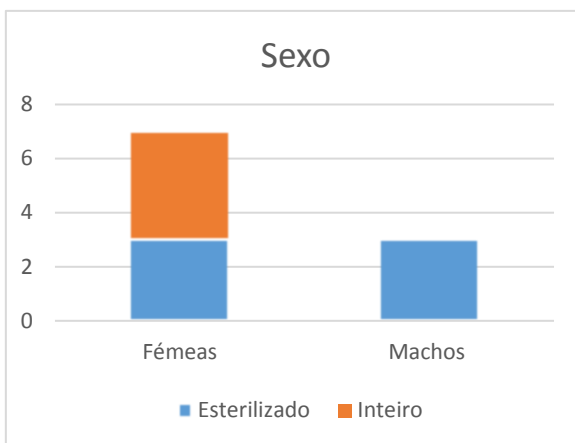


GRÁFICO 2 - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO SEXO

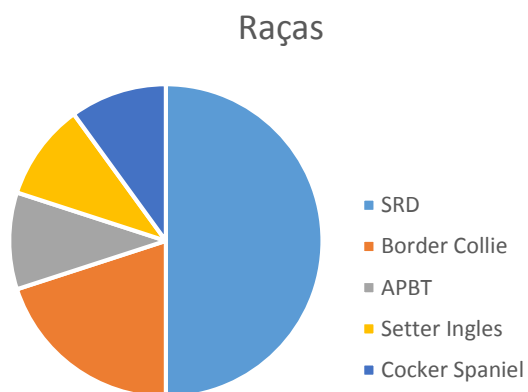


GRÁFICO 1 - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA QUANDO À RAÇA.

2. Resposta Comportamental

Grupo	Nome	Sinais de calma			Contenção física			Dificuldade de recolha			Total	Média
	Dia	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
C	Poncha	+	+	+	+		+	+	+	+	8	8.4
	Chica	++	++	++	+++	++	++	+++	+++	++	21	
	Miúdo	+	+	+							3	
	Brownie	+	+	+							3	
	Pi	+	+	+		+	+		+	+	7	
M	Amora	+	+	+				+			4	7.8
	Menta	+	+	+				+		+	5	
	Diva	+	+	++	+	++	+++			+++	13	
	Lupi	++	++	++	+	+	+	+			10	
	Cat	++	++	++				+			7	

QUADRO 4 - QUANTIFICAÇÃO SUBJETIVA DO NÍVEL DE ANSIEDADE NO GRUPO C E NO GRUPO M.

LEGENDA: __ AUSENTE, + LIGEIRO, ++ MODERADO, +++ ELEVADO

No quadro 3 está representado a quantificação do nível ansiedade. Esta quantificação é subjetiva pois é verificada através de indicadores indiretos. Podemos verificar que existem animais com níveis de ansiedade mais elevados em ambos os grupos, ainda assim a média do grupo C é maior (8.4) que a média do grupo M (7.8). O animal com maior nível de ansiedade foi a Chica (grupo C) que pontuou 21 pontos num máximo de 27 pontos. Os animais com menor nível de ansiedade foram o Miúdo e a Brownie ambos do grupo C que pontuaram 3. Os sinais de calma mais comuns foram o olhar para o lado, bocejar e lambe o lábio superior.

Em relação às frequências cardíacas e respiratórias, podemos verificar na tabela 1 os valores para o grupo C e para o grupo M. Podemos verificar que as médias tanto da frequência cardíaca como da frequência respiratória são mais elevadas no grupo C. Como referido no capítulo dos materiais e métodos, os valores foram obtidos apenas na primeira visita, antes da recolha de sangue.

GRUPO C			GRUPO M		
NOME	FC	FR	FC	FR	NOME
PONCHA	112	48	84	28	AMORA
CHICA	92	28	80	40	MENTA
MIÚDO	80	36	84	18	DIVA
BROWNIE	152	36	68	28	LUPI
PI	85	32	80	32	CAT
MÉDIAS	104.2	36	79.2	29.2	MÉDIAS

TABELA 1 - FREQUÊNCIAS CARDÍACAS (FC) E FREQUÊNCIAS RESPIRATÓRIAS (FR) DOS GRUPO CONTROLO (C) E O GRUPO DE MARCADORES (M)

O pressuposto da normalidade foi validado na dimensão FC, através do teste Shapiro-Wilk ($n < 50$) para todos os grupos, como podemos ver na tabela 2. Assim, verifica-se a existência de uma distribuição normal para toda população uma vez que ambos grupos apresentam p-value superior $\alpha .05$ (α de referência).

Relativamente, ao pressuposto de homogeneidade de variâncias o p-value (based on mean - 0.040) não é superior $\alpha 0.05$, como expresso na tabela 3. Por esta razão, o efeito do grupo ao nível da dimensão FC foi analisado através de um teste não-paramétrico, depois de não ter sido validado o pressuposto da homogeneidade de variâncias. O teste não paramétrico escolhido é o Mann-Whitney que é uma alternativa ao teste paramétrico T-Student. O teste Mann-Whitney permite comparar duas populações de onde foram extraídas amostras independentes face à dimensão FC (Maroco, 2010).

Teste de Normalidade

	Treinado	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Frequência Cardíaca	Não	,261	5	,200	,857	5	,218
	Sim	,348	5	,047	,779	5	,054

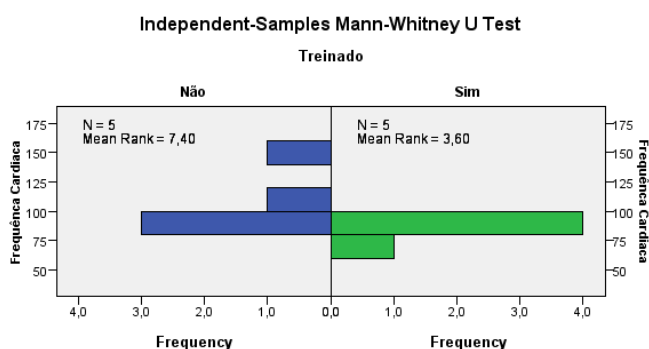
TABELA 2 - TESTE DE NORMALIDADE PARA A VARIÁVEL FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC)

Teste de Homogeneidade de Variâncias

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Frequência Cardíaca	Based on Mean	6,019	1	8	,040
	Based on Median	2,144	1	8	,181
	Based on Median and with adjusted df	2,144	1	4,343	,212
	Based on trimmed mean	5,578	1	8	,046

TABELA 3 - TESTE DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS PARA A VARIÁVEL FREQUÊNCIA CARDÍACA.

No que concerne à análise das medianas entre os grupos e a dimensão FC verificaram-se diferenças marginalmente significativas face à variável FC ($p = 0,056$). Neste caso, não aceitamos a H_0 , ou seja, a distribuição dos níveis de FC não é semelhante nas categorias da variável Treino. Por outras palavras, o grupo C apresenta diferenças estatisticamente significativas face ao grupo M.



Total N	10
Mann-Whitney U	3,000
Wilcoxon W	18,000
Test Statistic	3,000
Standard Error	4,714
Standardized Test Statistic	-2,015
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,044
Exact Sig. (2-sided test)	,056

TABELA 4 - TESTE DE MANN-WHITNEY PARA A VARIÁVEL FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC)

3. Serotonina

Serotonina no Grupo C

Nome	Idade	Sexo	Castrado	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Médias
Poncha	6	Fêmea	Não	312,7	336,9	403,2	350.93
Chica	2	Fêmea	Não	503,7	306	283,1	364.26
Miúdo	8	Macho	Sim	297	355,2	292,5	314.9
Brownie	6	Fêmea	Sim	231,4	163,9	108,2	167.83
Pi	3	Macho	Sim	245,2	213,9	201,2	220.1
Médias				338	275.18	257.64	

TABELA 5 - RESULTADOS PARA O GRUPO C: IDADE, SEXO, CONCENTRAÇÃO DE SEROTONINA EM µG/L

Serotonina no Grupo M

Nome	Idade	Sexo	Castrado	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Médias
Amora	4	Fêmea	Sim	260,2	329,7	166,6	252.16
Menta	2	Fêmea	Não	215,3	356,3	118	166.65
Diva	1	Fêmea	Não	114,4	171,7	31,7	143,05
Lupi	3	Macho	Sim	183,4	214,3	247,2	214,96
Cat	3	Fêmea	Sim	162,8	178,8	142,4	161,33
Médias				187.22	250.16	141.18	

TABELA 6- RESULTADOS PARA O GRUPO M: IDADE, SEXO, CONCENTRAÇÃO DE SEROTONINA EM µG/L

Os resultados da concentração de serotonina do grupo C e M estão representadas na tabela 5 e 6 respetivamente. É possível verificar os valores de serotonina diários bem como as médias por dia e por animal.

Os valores médios de serotonina foram calculados para o grupo C e grupo M e estão representados na tabela 7. A média do grupo C é de 269.66 µg/L e a média do grupo M é de 187.63 µg/L.

MÉDIAS DOS VALORES DE SEROTONINA

GRUPO C		GRUPO M	
Nomes	Média µg/l	Nomes	Média µg/l
Poncha	350,93	Amora	252,16
Chica	294.55	Menta	166.65
Miúdo	314,90	Diva	143,05
Brownie	167,83	Lupi	214,96
Pi	220,10	Cat	161,33
Médias	269.66	Médias	187.63

TABELA 7 - MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE SEROTONINA EM µG/L PARA O GRUPO C E GRUPO M.

Um dos aspetos da inferência estatística é o processo de comparação de grupos face a uma variável dependente tendo como base testes paramétricos ou testes não-paramétricos. A escolha do tipo de teste a adotar é realizada através da verificação de dois pressupostos: a) a variável dependente possua uma distribuição normal e b) as variâncias populacionais sejam homogêneas, caso se compare duas ou mais populações (Marôco, 2014).

Como é possível ver na tabela 8, o pressuposto da normalidade foi validado para a variável Serotonina, através do teste Shapiro-Wilk ($n < 50$). Assim, verifica-se a existência de uma distribuição normal para toda população uma vez que ambos grupos apresentam *p-value* superior $\alpha 0,05$ (α de referência). Relativamente, ao pressuposto de homogeneidade de variâncias (tabela 9) o *p-value* é superior $\alpha 0,05$ (α de referência). Por esta razão, o efeito do grupo ao nível da dimensão Serotonina foi analisado através de um teste paramétrico, pois tanto o pressuposto da normalidade como o da homogeneidade de variâncias foi validado (Marôco, 2014).

O teste paramétrico escolhido foi o Modelo Linear Misto, baseado numa análise nested, que é um teste utilizado para descrever a relação entre uma variável resposta e uma ou mais co-variáveis em dados agrupados de acordo com um ou mais fatores, tais como dados longitudinais, medições repetidas, dados com estrutura hierárquica e planeamento com blocos (Pinheiro & Bates, 2000).

Teste de Normalidade

	Treinado	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Serotonina	Não	,231	5	,200	,946	5	,708
	Sim	,280	5	,200	,910	5	,465

TABELA 8 - TESTE DE NORMALIDADE PARA O DOMÍNIO SEROTONINA

Teste de Homogeneidade de Variâncias

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Serotonina	Based on Mean	2,250	1	8	,172
	Based on Median	,723	1	8	,420
	Based on Median and with adjusted df	,723	1	7,224	,423
	Based on trimmed mean	2,150	1	8	,181

TABELA 9 - TESTE DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS PARA O DOMÍNIO DA SEROTONINA

Através do Modelo Linear Misto (gráfico 4), verificou-se que há diferenças marginalmente significativas entre os tratamentos ($F(1,8) = 3.8$; valor $p = 0,087$). Por via da análise no modelo Nested verificaram-se diferenças significativas entre os animais, quando se considera o indivíduo dentro do tratamento com um valor p de 0,015 (gráfico 5).

Neste caso, não aceitamos a Hipótese Nula (H_0), ou seja, a distribuição dos níveis de Serotonina não é semelhante nas categorias da variável Treino.

Estatística de Grupo

		Treinado	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Serotonina	Não		5	269,6620	74,32450	33,23893
	Sim		5	187,6300	44,80591	20,03781

TABELA 10 - MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DO GRUPO C E M FACE À CONCENTRAÇÃO DE SEROTONINA

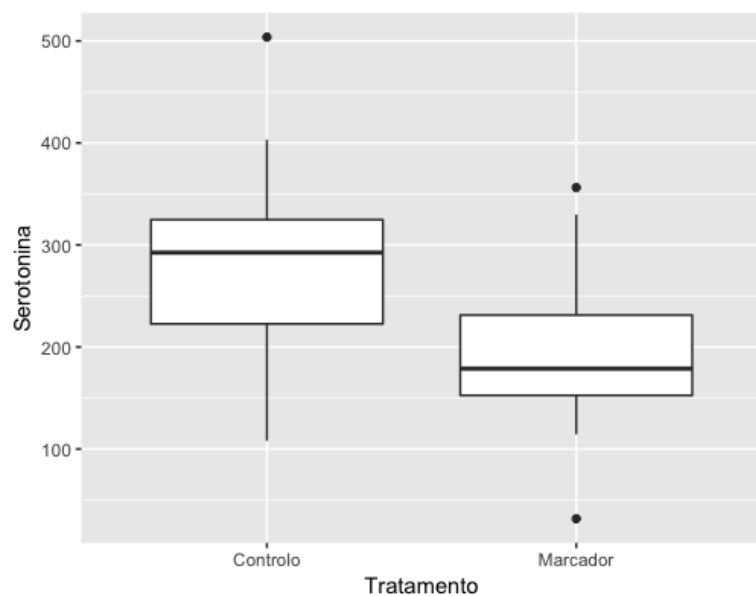


GRÁFICO 2 – MODELO LINEAR MISTO PARA A VARIÁVEL SEROTONINA

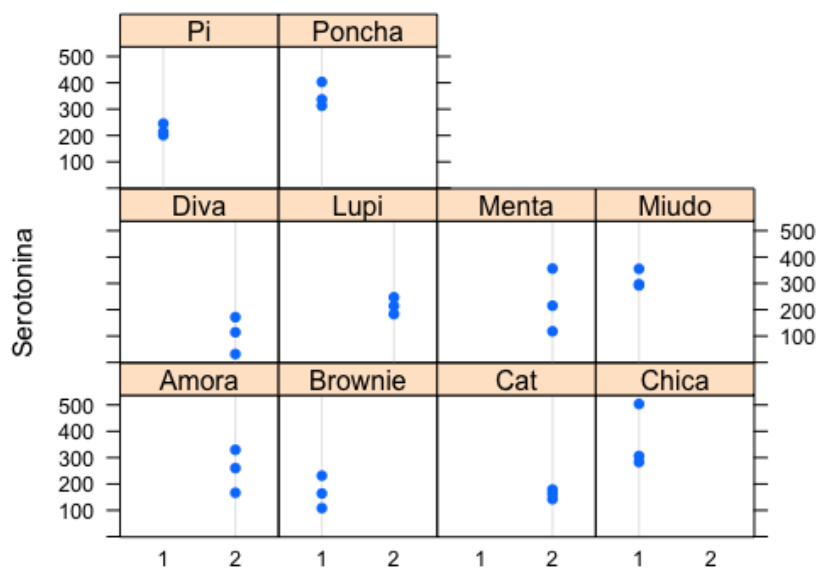


GRÁFICO 3 - DESENHO NESTED PARA A VARIÁVEL SEROTONINA

4. Dopamina

Os resultados da concentração de dopamina do grupo C e M estão representadas na tabela 12 e 13 respetivamente. É possível verificar os valores de dopamina diários bem como as médias por dia e por animal.

Os valores médios de dopamina foram calculados para o grupo C e grupo M e estão representados na tabela 14. A média do grupo C é de 56.93 ng/l e a média do grupo M é de 56.47 ng/l.

Dopamina no grupo C

Nome	Idade	Sexo	Castrado	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Médias
Poncha	6	Fêmea	Não	31	39	51	40,33
Chica	2	Fêmea	Não	44	48	34	42
Miúdo	8	Macho	Sim	61	85	45	63,66
Brownie	6	Fêmea	Sim	30	198	45	91
Pi	3	Macho	Sim	42	52	49	47,66
Médias				41,6	84,4	44,8	

TABELA 11 - CONCENTRAÇÕES DE DOPAMINA NO GRUPO C EM NG/L

Dopamina no grupo M

Nome	Idade	Sexo	Castrado	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Médias
Amora	4	Fêmea	Sim	49	62	47	52,67
Menta	2	Fêmea	Não	54	92	55	67
Diva	1	Fêmea	Não	58	49	63	56,67
Lupi	3	Macho	Sim	48	14	118	60
Cat	3	Fêmea	Sim	30	39	69	46
Médias				47,8	51,2	70,4	

TABELA 12 - CONCENTRAÇÕES DE DOPAMINA NO GRUPO M EM NG/L

MÉDIAS DOS VALORES DE DOPAMINA

GRUPO C		GRUPO M	
Nomes	Média (ng/l)	Nomes	Média (ng/l)
Poncha	40,33	Amora	52,67
Chica	42	Menta	67
Miúdo	63.66	Diva	56,67
Brownie	91	Lupi	60
Pi	47,66	Cat	46
Médias	56.93	Médias	56,47

TABELA 13 – VALORES MÉDIOS DE DOPAMINA (NG/L) PARA O GRUPO C E M

Tal como foi feito para a variável “Serotonina”, também no domínio Dopamina o pressuposto da normalidade foi validado através do teste Shapiro-Wilk ($n < 50$) (tabela 15). Assim, verifica-se a existência de uma distribuição normal para toda população uma vez que ambos grupos apresentam *p-value* superior a 0,05 (α de referência).

Relativamente, ao pressuposto de homogeneidade de variâncias o *p-value* tem um valor de 0.076, sendo superior a 0,05 (α de referência).

Da mesma forma que foi elaborado para a variável anterior, o efeito do grupo ao nível da dimensão Dopamina foi analisado através do Modelo Linear Misto.

Teste de Normalidade

	Treinado	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Dopamina	Não	,269	5	,200*	,845	5	,180
	Sim	,127	5	,200*	1,000	5	1,000

TABELA 14 - TESTE DE NORMALIDADE PARA A VARIÁVEL DOPAMINA

Teste de Homogeneidade de Variâncias

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Dopamina	Based on Mean	4,145	1	8	,076
	Based on Median	1,228	1	8	,300
	Based on Median and with adjusted df	1,228	1	4,590	,322
	Based on trimmed mean	3,745	1	8	,089

TABELA 15 - TESTE DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS PARA A VARIÁVEL DOPAMINA

No que diz respeito à análise das médias entre os grupos e a dimensão dopamina não se verificaram diferenças estatisticamente significativas ($F(1, 8)=1.95$; valor $p= 0,20$) como se pode ver no gráfico 6. Também no modelo Nested representado no gráfico 7, que considera o animal dentro do tratamento, não se registaram diferenças significativas entre os animais (valor $p=0,320$). Neste caso, aceitamos a H_0 , ou seja, a média dos níveis de dopamina não é diferente nas categorias da variável treino.

Estatística de Grupo

	Treinado	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Dopamina	Não	5	56,9300	21,15689	9,46165
	Sim	5	56,4640	7,86630	3,51792

TABELA 16 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA: MÉDIAS DOS VALORES DE DOPAMINA DO GRUPO C E GRUPO M.

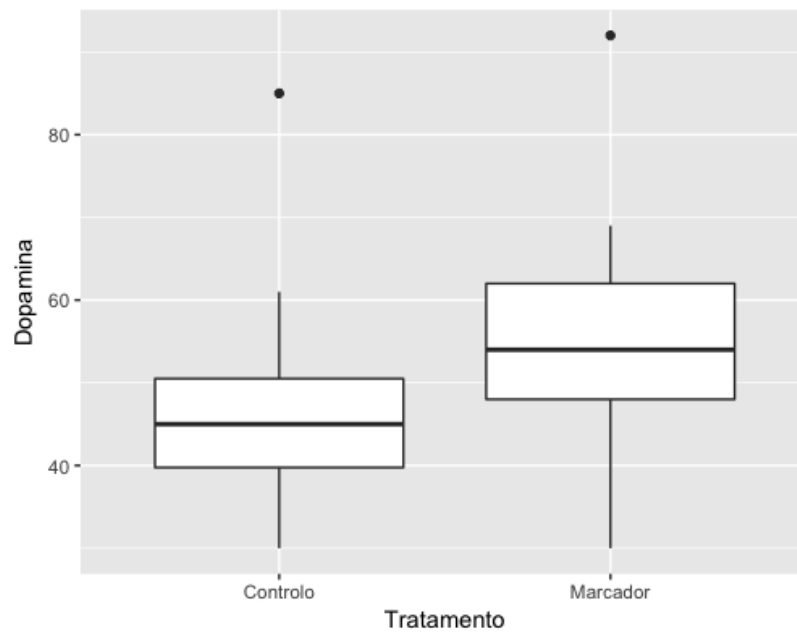


GRÁFICO 4 - MODELO LINEAR MISTO PARA O DOMÍNIO DOPAMINA.

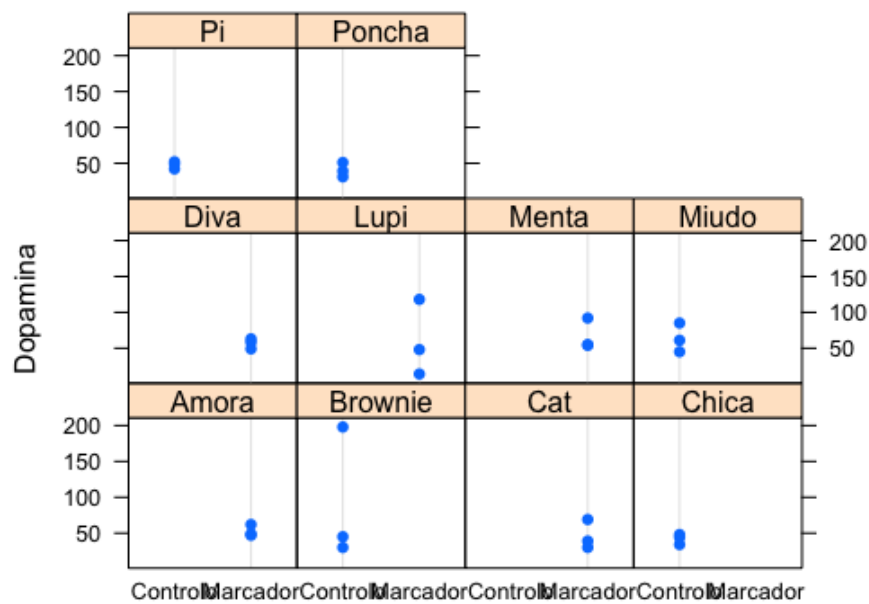


GRÁFICO 5 - MODELO NESTED PARA A VARIÁVEL DOPAMINA

VII. DISCUSSÃO

Realizou-se um estudo observacional, transversal e analítico com o objetivo de verificar se havia alterações neuroquímicas no cérebro de cães treinados. Os estudos transversais têm o inconveniente de impossibilitar a determinação da causa-efeito, por serem estudos que medem as características no presente sem acompanhar a evolução dos grupos amostrais. Existe desconhecimento sobre fatores do passado, fatores esses que podem influenciar os resultados, não sendo possível estabelecer uma prova causal (Center for Disease Control and Prevention, 2012). Este estudo foi classificado de transversal, apesar de existirem várias medições em cada animal e em momentos diferentes. No entanto, o objetivo dessas medições foi encontrar um valor médio e não o de avaliar esse valor ao longo do tempo, sendo por isso uma observação pontual.

Não foram encontrados estudos científicos que evidenciassem os valores basais em cães e que fossem ao encontro do objetivo de ter valores de comparação que pudessem constituir uma base de comparação. Por essa razão, este estudo é considerado de carácter exploratório, pois visa dar respostas a questões que não tinham sido feitas anteriormente e, portanto, original.

Para este estudo foram doseados e analisados os valores de serotonina e dopamina no sangue para dois os grupos de cães (cães treinados e não treinados). A recolha de sangue é um processo que poderá causar desconforto no animal e por isso, ser uma experiência mais ou menos desagradável, e que está dependente da sensibilidade do animal e o seu estado de ansiedade. O nível de ansiedade é um fator importante a ter em consideração quando analisamos os valores dos neurotransmissores, visto vários estudos sugerirem haver libertação de serotonina quando o indivíduo está sujeito a stresse psicológico (Kawahara et al., 1993, Lobo, et al., 1983), e durante a contenção física (Mo, et al., 2008).

Através da avaliação do comportamento dos animais durante a recolha de sangue, quantificou-se o nível de ansiedade do grupo C em 8.4 e do grupo M em 7.8. Também as frequências cardíacas medidas revelaram uma diferença marginal entre os grupos ($p=0.56$) com 104.2 bpm para o grupo C e 79.2 bpm para o grupo M. Assim, de um modo geral, podemos afirmar que os indivíduos do grupo C tinham um nível de ansiedade maior que os do grupo M.

Considerando estes resultados, poderíamos inferir que cães que não têm contacto com treino são mais suscetíveis a sensações de stress que cães treinados, já que, apesar da colheita ter sido realizada de forma igual para todos os animais, tentando sempre a minimizar o stress inerente ao procedimento, o grupo sem treino obteve valores médios mais elevados.

Em relação à serotonina, sabemos que é um neurotransmissor importante para várias funções do organismo, como já descrito anteriormente, tendo ainda uma relação com o comportamento e bem-estar dos cães, relacionando-se especificamente com tendências depressivas (Lindsay, 2000c), comportamentos compulsivos (Rapoport, Ryland, & Kriete, 1992), agressividade e os comportamentos impulso-controlo (Seo, Patrick, & Kennealy, 2008).

Os valores fisiológicos de serotonina para humanos variam entre os 50 e 200 µg/l (Chernecky & Berger, 2013), sendo que, tal como referido, os valores de referência para cães não foram encontrados. Ou seja, não existem estudos realizados no sentido de avaliar o intervalo de valores considerado normal, bem como as diferenças que possam surgir entre sexos, raças ou idades. No entanto, pesquisámos alguns estudos em que foram utilizados cães e cuja a metodologia passava por dosear a serotonina. Nesses estudos a serotonina foi medida em dois grupos, sendo um deles o grupo de controlo. Nesses grupos de controlo os valores médios foram de 265,75 µg/l (Kocis, et al., 2015) e 387,4 ng/ml (Rosado, et al., 2010).

Os resultados encontrados neste estudo para a serotonina foram de 269,66 µg/l e 187,63 µg/l, para o grupo C e o grupo M, respetivamente. Através desses resultados, podemos observar que existem diferenças marginais para as médias dos grupos estudados a nível da serotonina ($p=0,87$). O grupo com níveis de serotonina mais elevados é o grupo C, ou seja, o grupo que não tinha contacto com nenhum tipo de treino.

Comparando os valores de serotonina acima referidos com os resultados obtidos na resposta comportamental, podemos verificar que o grupo C era o grupo que tinha maior nível de ansiedade e cujas frequências cardíacas médias estavam mais elevadas. Assim, seria expectável que os valores de serotonina desse grupo fossem mais elevados relativamente ao valor fisiológico de referência. Ainda assim, o valor encontrado para o grupo C, vai ao encontro do valor referido por Kocis (2015) para o grupo controlo.

Para confirmar este resultado seria necessário ter uma amostra de maiores dimensões, bem como a limitação nos critérios de seleção em relação à comida que o animal ingere e ao tempo de luz solar que o animal tem acesso.

Um dos fatores importantes na dosagem de serotonina é a garantir que os animais têm uma alimentação semelhante. Teria sido vantajoso introduzir nos critérios de seleção uma limitação relacionada com o tipo de alimentação, ou em alternativa, fornecer aos animais em estudo a mesma alimentação durante um período específico de tempo. Vários estudos apontam que a alimentação pode ter um grande impacto nos níveis de triptofano e, consequentemente, nos níveis de serotonina. (Scheachter & Wurtman, 1990)

Para estudos futuros, será conveniente a recolha de sangue ser efetuada em todos os animais no mesmo dia, de forma a que todos estejam sob as mesmas condições. Foram realizados estudos em humanos que verificaram um aumento sazonal de serotonina nos meses de maior luz solar em comparação com os meses de menor luz solar, bem como, aumentos diários relacionados com o número de horas de exposição solar (revisto por (Azmitia, 2010). Tendo em conta que as recolhas foram efetuadas de Janeiro a Maio, não podemos garantir que a luz solar não tenha tido influência nos resultados.

Em relação à dopamina, não se registaram diferenças entre as médias dos grupos, que apresentaram uma média muito semelhante (56,6 ng/l e 56,9 ng/l). Este resultado leva-nos a crer que não existem alterações permanentes na neurobioquímica cerebral de cães treinados, no que respeita ao neurotransmissor dopamina.

Embora haja evidência científica que a dopamina tem um papel importante ao nível do reforço e da motivação (Hollerman & Schultz, 1998) e que tende a aumentar na predição da recompensa (Colombo, 2014), neste estudo não existiu evidência que indique que há um aumento permanente da dopamina em animais com treino intensivo com marcadores. Devido ao número limitado de animais no estudo, não poderá ser generalizado o não aumento de dopamina nas circunstâncias anteriormente descritas. Estudos com maior dimensão de amostra podem confirmar os resultados observados.

Para estudos futuros, será aconselhável ter em conta alguns fatores a nível da metodologia, nomeadamente a nível de amostragem, como já havia sido referido, seria favorável uma amostra de maiores dimensões para que os resultados fossem mais expressivos e com maior confiança. Em relação aos critérios de seleção seria vantajoso optar por uma amostra mais homogénea no que diz respeito à idade, sexo e raça, visto

que não há conhecimento como estes fatores podem afetar os resultados. Outro aspeto a ter em consideração será a proveniência dos animais e como decorreu os períodos neonatal, transitório e de sociabilização. Animais que são separados dos progenitores cedo demais têm maior probabilidade para manifestar ansiedade através de comportamentos excessivos (Pierantoni, Albertini & Pirrone, 2011).

Os animais que têm treino utilizando reforço positivo, têm uma resposta neuroquímica à recompensa, nomeadamente da dopamina, que tende a aumentar no momento que precede a recompensa (Schultz, 1998). O sistema mesotenlencefálico de neurotransmissão dopaminérgica é ativado na componente motivacional do reforço, *o querer*, e em relação à componente hedonística, *o gostar*, este relaciona-se com o sistema de neurotransmissão do GABA/benzodiazepínico que, como visto anteriormente, tem uma ação inibitória/ansiolítica (Berridge, 1996). Sabe-se que o mesmo sistema dopaminérgico relacionado com a motivação, é o mesmo que é ativado em situações de consumo de drogas e adições (Oliveira, 2012). Também Gearhardt, et al., (2011) referem que os sintomas da adição alimentar em humanos correlacionam-se com uma ativação elevada do circuito de reforço (cingulado anterior, córtex orbitofrontal e amígdala) durante a antecipação da ingestão de comida. As mesmas estruturas estão implicadas no Transtorno Obsessivo-Compulsivo em humanos (Graybiel & Rauch, 2000). Também a nível serotoninérgico existem alterações neuroquímicas já que tanto em casos de adição como de compulsividade foram detetadas diminuições do nível de serotonina (Zohar *et al.*, 1987, Schmidt, Vassoler & Pierce, 2011).

Existe uma relação próxima entre reforço positivo, adição e compulsividade. Quando comparamos os resultados obtidos neste estudo com os resultados referidos na bibliografia podemos argumentar que, a nível serotoninérgico, a diminuição dos valores de serotonina do grupo M poderá estar relacionada com uma componente aditiva/compulsiva que os animais treinados com marcadores possam desenvolver.

Para entendermos até que ponto poderá haver uma componente compulsiva no comportamento destes cães, seria bastante interessante, em estudos futuros, medir também o glutamato. Este neurotransmissor tem uma grande importância na modulação da aprendizagem e da memória, além de participar nos processos de adição. (Kalivas, Lalumiere, Knackstedt, & Shen, 2009)

VIII. CONCLUSÃO

Este estudo tinha o objetivo de compreender se o treino tem uma influência permanente na bioquímica cerebral dos cães. Atendendo à sua popularidade e difusão através do treino de *clicker*, este método verificou-se bastante eficaz quando comparado com outros métodos anteriormente utilizados. Porém, apesar da sua utilização massiva, ainda não é possível explicar claramente como é que os marcadores, em particular o *clicker*, funcionam de um ponto de vista da bioquímica cerebral.

Atendendo aos objetivos específicos estabelecidos para este estudo, foi possível determinar os valores padrão para os neurotransmissores estudados através do grupo controlo. Esta informação por si só é bastante relevante para a comunidade médico-veterinária, visto que são escassas as referências na literatura sobre valores destes neurotransmissores em cães.

A comparação de valores de serotonina entre cães treinados e não treinados revelou diferenças marginalmente significativas ($p\text{-value} = 0,087$), havendo uma diminuição dos valores no grupo de cães treinados com marcadores de treino. Este resultado, sugere que existe uma componente aditiva/compulsiva no treino com marcadores de treino, visto que o circuito cerebral do reforço é ativado em situações de compulsão/adição e também a diminuição de serotonina é comum em pacientes com este tipo de distúrbios.

A nível da dopamina não foram detetadas diferenças nas médias dos grupos, revelando que não existe uma estimulação dopaminérgica permanente em cães treinados (com marcadores de comportamento).

Avaliando ainda a resposta comportamental dos animais quando manipulados, podemos verificar que animais não treinados revelaram, de uma forma geral, maior nível de ansiedade que os animais treinados. Este resultado, juntamente com inúmeros estudos sobre o treino canino e os seus benefícios, é lícito concluir que cães treinados se harmonizam com mais facilidade a situações adversas do que cães não treinados.

Atendendo ao objetivo geral, é possível afirmar, com base nos resultados deste estudo, que o treino de marcadores afeta a neurobioquímica cerebral do cão, visto que existe uma diminuição de serotonina em cães treinados com marcadores. Apesar de ser conveniente a replicação com uma amostra de maiores dimensões para confirmar estes resultados, este

estudo apresenta uma mais-valia para a compreensão da neurofisiologia canina da aprendizagem em cães.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Abraham, W. (2008). Metaplasticity: turning synapses and networks for plasticity. *Natural Review Neuroscience*, 9, 387-399.
- American Veterinary Society of Animal Behavior. (2008). Guidelines on use of punishment for dealing with behavior problems in animals. *AVSAB*.
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2007). *The Hippocampus Book*. New York: Oxford University Press.
- Audhya, T., Adams, J. B., & Johansen, L. (2012). Correlation of serotonin levels in CSF, platelets, plasma, and urine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1496-1501. doi:10.1016/j.bbagen.2012.05.012
- Azmitia, E. (2010). Evolution of Serotonin: Sunlight to Suicide. *Handbook of Behavioral Neurobiology of Serotonin*, 23, pp. 3-22. doi:10.1016/S1569-7339(10)70069-2
- Bahena-Trujillo, R., Flores, G., & Arias-Montaña, J. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*, 11, 39:60.
- Berridge, K. (1996). Food Reward: Brain Substrates of Wanting and Liking. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 20, 1-25. doi:10.1016/0149-7634(95)00033-B
- Berridge, K., & Kringelbach, M. (2013). Neuroscience of affect: Brain mechanisms of pleasure and displeasure. 23, 294-303. doi:10.1016/j.conb.2013.01.017
- Boadle-Biber, M. C. (1993). Regulation of Serotonin Synthesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1, 1-15. doi:10.1016/0079-6107(93)90009-9
- Breedlove, S. M., Watson, N., & Rosenzweig, M. (2010). *Biological Psychology: An Introduction to Behavioral, Cognitive, and Clinical Neuroscience*. Sunderland: inauer Associates, Inc. Publishers.
- Carlson, N. (2012). Learning and Memory. Em N. Carlson, *Psychology: the science of behavior* (11ª ed., pp. 457-458). Boston: Allyn & Bacon.
- Case, L. P. (2010). How dogs and cats learn: Principles of Learning Theory. Em L. P. Case, *Canine and Feline Behavior and Training: A complete guide to understand our two best friends*. New York: Delmar.

- Celada, P., Martin, F., & Artigas, F. (1994). Effects of chronic treatment with dexfenfluramine on serotonin in rat blood, brain and lung tissue. *Life Science*, 55, 1237-43.
- Center for Disease Control and Prevention. (2012). *Principles of Epidemiology in Public Health Practice* (3^a ed.). Atlanta.
- Center for Disease Control and Prevention. (2012). *Principles of Epidemiology in Public Health Practice* (3 Ed ed.). Atlanta.
- Chernecky, C., & Berger, B. (2013). Serotonin (5-hydroxytryptamine) - serum or blood. Em C. Chernecky, & B. Berger, *Laboratory Tests and Diagnostic Procedures* (pp. 1010-1011). St. Louis, MO: Elsevier Saunders.
- Colombo, M. (2014). Deep and beautiful. The reward prediction error hypothesis of dopamine. 57-67. doi:10.1016/j.shpsc.2013.10.006
- Da Prada, M., Censura, A., Launay, J., & Richards, J. (1988). Platelets as a model for neurones? *Experientia*, 44, 115-126.
- Davis, M. (1997). Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. *J Neuropsychiatry Clin*(9), 382-402.
- Domjan, M. (2003). *The principles of learning and behavior* (5^a ed.). Belmont: Thomson Brooks/Cole Publishing Co.
- Domjan, M. (2015). Background and Rationale for the Study of Learning and Behavior. Em M. Domjan, *The Principles of Learning and Behavior* (7^a ed., p. 14). Texas: Cengage.
- Eysenck, M., & Keane, M. (2017). *Manual de Psicologia Cognitiva* (7^a ed.). São Paulo: Artmed.
- Fields-Babineau, M. (2006). Get Clicked . Em M. Fields-Babineau, *Click & Easy - Clicker Training For Dogs*. New Jersey: Wiley Publishing.
- Fraser, A. F. (1985). Background to anomalous behavior. *Applied Animal Behavior*, 13, 199-203.
- Frawley, E. (12 de Fevereiro de 2009). *The Power of Training Dogs with Markers or Clickers*. Obtido de Leerburg.com: <http://leerburg.com/pdf/markers-clickers.pdf>
- Fukuzawa, M., Mills, D., & Cooper, J. (2005). The effect of human command phonetic characteristics on auditory cognition in dogs (*Canis familiaris*). *Journal of Comparative Psychology*, 117-120. doi:10.1037/0735-7036.119.1.117
- Gearhardt, A. N., Yokum, S., Orr, P., Stice, E., Corbin, W. R., & Brownell, K. D. (2011). Neural correlates of food addiction. *Archives of General Psychiatry*, 68, 808-816.

- Graybiel, A., & Rauch, S. (2000). Toward a Neurobiology of Obsessive-Compulsive Disorder. *Cell Press*, 28, 343-347. doi:10.1016/S0896-6273(00)00113-6
- Habib, M. (2003). Componentes Celulares do Sistema Nervoso Central. Em M. Habib, *Bases Neurológicas dos Comportamentos*. Lisboa: Climepsi.
- Henke, K. (2010). A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. *Nature Reviews. Neurosciencie*, 523-32. doi:10.1038/nrn2850
- Hensler, J. (2012). Serotonin. Em B. Scott, & G. Siegel, *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology* (8ª ed., p. 301). Elsevier Inc.
- Hollerman, J., & Schultz, W. (1998). Dopamine neurons report an error in the temporal prediction of reward during learning. doi:10.1038/1124
- Kalivas, P., Lalumiere, R., Knackstedt, L., & Shen, H. (2009). Glutamate Transmission in Addiction. *Neuropharmacology*, 56, 169-173.
- Kawahara, H., Yoshida, M., Yokoo, H., Nishi, M., & Tanaka, M. (1993). Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. *Neuroscience Letters*, 162, pp. 81-84.
- Kazdin, A. E. (2013). Principles of Operant Conditioning. Em A. E. Kazdin, *Behavior Modification in Applied Settings* (7ª ed.). Long Grove, Illinois: Waveland Press Inc.
- Kelley, A., & Berridge, K. (2002). The Neuroscience of Natural Rewards: Relevance to Addictive Drugs. *The Journal of Neuroscience*, 22, 3306-3311.
- Kocis, A., Astrid, G., Simone, Z., Petruse, C., Brudiu, I., Carpinisan, L., & Tibru, J. (2015). The impact of dog feeding on their aggressiveness. *Adv.Anim.Vet.Sci*, 3, 503-506. doi:10.14737/journal.aavs/2015/3.9.503.506
- Koshikawa, N. (1994). Role of the nucleus accumbens and the striatum in the production of turning behaviour in intact rats. *Rev Neuroscience*, 5, 331-346.
- Landsberg, G., Hunthausen, W., & Ackerman, L. (2013). Stereotypic and compulsive disorder. Em G. Landsberg, W. Hunthausen, & L. Ackerman, *Behavior Problems of the Dog and Cat* (3ª ed.). Elsevier Ltd.
- LeDoux, J. (2003). The Emotional Brain, Fear and the Amygdala. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 23(4), 727-738.
- Lindsay, S. R. (2000a). Classical Conditioning. Em S. R. Lindsay, *Handbook of Applied Dog Behavior and Training: Adapting and Learning* (Vol. 1). Iowa: Blackwell Publishing.
- Lindsay, S. R. (2000b). Instrumental Learning. Em *Handbook of Applied Dog Behavior and Training: Adapting and Learning* (Vol. 1). Iowa: Blackwell Publishing.

- Lindsay, S. R. (2000c). Neurobiology of Behavior and Learning. Em S. R. Lindsay, *Handbook of Applied Dog Behavior and Training: Adapting and Learning* (Vol. 1). Iowa: Blackwell Publishing.
- Lindsay, S. R. (2001). In S. R. Lindsay, *Handbook of Applied Dog Behavior and Training: Etiology and assessment of behavior problems* (Vol. 2). Iowa: Iowa State University Press.
- Lobo, R., Granger, L., Goebelsmann, U., & Misiiell, D. (1983). Psychological stress and increases in urinary norepinephrine metabolites, platelet serotonin, adrenal androgens in women with polycystic ovary syndrome. *The C.V Mosby Co.*, 145.
- Lombroso, P. (2004). Aprendizado e memória. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 26, 207-210.
- Marôco, J. (2014). *Análise estatística com o SPSS Statistics* (6 ed ed.). Pêro Pinheiro: ReportNumber.
- Mills, D. S. (2005). What's in a word? Recent findings on the attributes of a command on the performance of pet dogs. *Anthorzoos*(18), 208-221.
- Mills, D. S. (2006). Técnicas de Aprendizaje, entrenamiento y modificación de la conducta. Em D. Horwitz, D. Mills, & S. Heath, *BSAVA Manual del Comportamiento en Pequeños Animales*. Barcelona: Ediciones.
- Mo, B., Feng, N., Renner, K., & Forster, G. (2008). Restraint stress increases serotonin release in the central nucleus of the amygdala via activation of corticotropin-releasing factor receptors. *Brain Research Bulletin*, 76, pp. 493-498.
- Morris, R., Garrud, P., Rawlins, J., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 681-683.
- Nadal-Vicens, M., Chyung, J. H., & Turner, T. J. (2009). Farmacologia da Neurotransmissão Serotoninérgica e Adrenérgica Central. Em D. E. Golan, *Principios de Farmacologia* (2ª ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Netter, F. (2013). *Coleção Netter de Ilustração Médicas: Sistema Nervoso: Parte I - Cérebro* (2ª ed., Vol. 7). (R. Jones, T. Burns, M. Aminoff, & S. Pomeroy, Edits.) Rio de Janeiro: Saunders.
- Nichols, D., & Nichols, C. (2008). Serotonin Receptors. *Chemical Reviews*, 108, 1614-1641.
- Nicoll, R., & Roche, K. (2013). Long-term potentiation: peeling the onion. *Neuropharmacology*. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.02.010
- Normal Hormone Reference Ranges. (2011). Em *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology* (9ª ed.). McGraw-Hill Companies.
- Oliveira, A. (2012). Neurobiologia dos Comportamentos Aditivos. *Tese de Mestrado Integrado em Medicina, Faculdade de Medicina - Universidade do Porto*.

- Overall, K. (2013a). Abnormal Canine Behaviors and Behavioral Pathologies Not Primarily Involving Pathological Aggression. Em K. Overall, *Manual of Clinical Behavior Medicine for Dogs and Cats* (pp. 231- 310). Canada: Elsevier.
- Overall, K. (2013b). Changing Behavior. Em K. Overall, *Manual of Clinical Behavior Medicine for Dogs and Cats*. Canada: Elsevier Mosby Inc.
- Overall, K., & Dunham, A. (2002). Clinical features and outcome in dogs and cats with obsessive-compulsive disorder: 126 cases (1989- 2000). *J Am Vet Med Assoc*, 1445-52.
- Panksepp, J. (1998). *Affective Neuroscience: The Foundations of Human and Animal Emotions*. New York: Oxford University Press.
- Pegreat, P. (2000). Psicopatologia general. Em *Patología del Comportamiento del Perro* (2ª ed.). Barcelona: Pulso Ediciones.
- Perry, D. G., & Parke, R. (1975). Punishment and alternative response training as determinants of response inhibition in children. *Genetic Psychology Monographs*, 91, 257-79.
- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1992). Differential Contribution of Amygdala and Hippocampus to Cued and Contextual Fear Conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 106(2), 274-285.
- Pierantoni, L., Albertini, M., & Pirrone, F. (2011). Prevalence of owner-reported behaviours in dogs separated from litter at two different ages. *Vet Rec*, 468. doi:10.1136/vr.d4967
- Pinheiro, J., & Bates, D. (2000). *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer-Verlag.
- Pryor, K. (2005). *What is Clicker Training?* Obtido em 13 de Fevereiro de 2016, de Karen Pryor Clicker Training : www.clickertraining.com/files/clickertraining.pdf
- Pryor, K. (2009). Answers. Em K. Pryor, *Reaching Animal Mind: Clicker Training and What It Teaches Us about All Animals* (pp. 171-189). New York: Scribner.
- Rapoport, J. L., Ryland, D. H., & Kriete, M. (1992). Drug Treatment Of Canine Aural Lick: An Animal Model of Obsessive-compulsive Disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 49, 517-521.
- Rosado, B., Belenguer, S., Leon, M., Chacon, G., Villegas, A., & Palacio, J. (2010). Blood concentration of serotonin, cortisol and dehydroepiandrosterone in aggressive dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 123, 124-130. doi:10.1016/j.applanim.2010.01.009
- Ruggiero, R., Bueno-Júnior, L., Ross, J., Fachim, H., Padovan-Neto, F., Merlo, S., . . . Moreira, J. (2011). Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica:

- aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 143-56.
- Sadeh, T., Shohamy, D., Levy, D., Reggev, N., & Maril, A. (2011). Cooperation between the hippocampus and the striatum during episodic encoding. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 1597-608. doi:10.1162/jocn.2010.21549
- Sah, P., Faber, E., Lopez de Armentia, M., & Power, J. (2003). The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. *Physiological Reviews*, 83(3), 803-834. doi:10.1152/physrev.00002.2003
- Santos, A. (2009). Limitations on Prompt-Based Training. *Journal of Applied Companion Animal Behavior*, 3(1), 51-55.
- Sapolsky, R. (2005). The Plesure (and Pain) of "Maybe". Em R. Sapolsky, *Monkeyluv: And Other Essays On Our Lives As Animals* (pp. 89-96). New York: Scribner.
- Scheachter, J., & Wurtman, R. (1990). Serotonin release varies with brain tryptophan levels. *Brain Reseach*, 532, pp. 203-210.
- Schmidt, H., Vassoler, F., & Pierce, R. (2011). Neurobiological Factors of Drug Dependence and Addiction. Em R. P. Lowinson JH, *Substance abuse: a comprehensive textbook* (5ª ed., pp. 55-69). Lippincott Williams & Wilkins.
- Schultz, W. (1998). Predictive Reward Signal of Dopamine Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 80, 1-27.
- Schultz, W. (2016). Dopamine reward prediction-error signalling: a two-component response. *Nature Reviews Neuroscience*, 17, 183-195. doi:10.1038/nrn.2015.26
- Seo, D., Patrick, C., & Kennealy, P. (2008). Role of serotonin and dopamine system interactions in the neurobiology of impulsive aggression and its comorbidity with other clinical disorders. *Aggression and Violent Behavior*, 13, 383-395.
- Smith, K. S., Berridge, K. C., & Aldridge, J. W. (5 de Julho de 2011). Disentangling pleasure from incentive salience and learning signals in brain reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 255-264.
- Squire, L., & Kandel, E. (1999). *Memory: From Mind to Molecule*. New York: Scientific American Library.
- Standaert, D., & Galanter, J. (2009). Farmacologia da neurotransmissão dopaminérgica. Em D. Golan, A. Tashjian Jr., E. Armstrong, & A. W. Armstrong, *Princípios da Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia* (2 ed., pp. 166-185).
- Thompson, R., Berger, T., & IV Madden, J. (1983). Cellular processes of learning and memory in the mammalian CNS. *Annual Review Neuroscience*, 6, 447-491. doi:10.1146/annurev.ne.06.030183.002311

- Vilanova, X. M. (2002). Otros problemas de comportamiento del perro. Em X. M. Vilanova, *Etología Clínica Veterinaria* (2ª ed.). Barcelona: Multimédica.
- Waymire, J. (6 de Maio de 2016). *Neuroscience Online*. Obtido de Chapter 10: Transport and the Molecular Mechanism of Secretion: <http://neuroscience.uth.tmc.edu/s1/chapter10.html>
- Whitehead, S. (Maio de 2011). Clicker training - neurochemistry in action. *Veterinary Nursing Journal*, 26(5), 165-166. doi:10.1111/j.2045-0648.2010.00044.x
- Wittenberg, G. M., & Tsien, J. Z. (2002). An emerging molecular and cellular framework for memory processing by the hippocampus. *TRENDS in Neurosciences*, 25(10), 501-505. doi:10.1016/S0166-2236(02)02231-2
- Yin, S. (2004). *How to Behave So Your Dog Behaves*. New Jersey: TFH Publications.
- Yin, S. (2009a). Classical Conditioning. Em S. Yin, *Low Stress Handling, Restraint and Behavior Modification of Dogs & Cats*. Cattledog Publishing.
- Yin, S. (2009b). Operant Conditioning Basics. Em S. Yin, *Low Stress Handling, Restraint and Behavior Modification of Dogs and Cats*. Cattledog Publishing.
- Zohar, J., Mueller, E. A., Insel, T. R., Zohar-Kadouch, R. C., & Murphy, D. L. (1987). Serotonergic Responsivity in Obsessive-Compulsive Disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 946-951. doi:10.1001/archpsyc.1987.01800230026006

X. ANEXOS

ANEXO 1 - Efeitos dos marcadores de treino na neurobioquímica cerebral do cão

Identificação do cão

COD: _____ C.C: _____
Raça: _____ FC: _____
Sexo: _____ FR: _____
Idade: _____

Declaro que o meu cão não sofre de patologias crônicas ou agudas, não toma medicação, não apresenta sinais de doenças comportamentais e tem um comportamento natural de canídeo.

Características do Treino

Início do treino: _____
Quantas horas por semana: _____ Quantas vezes por semana: _____
Treino básico de obediência: Senta ☐ Deita ☐ Andar Junto ☐ Quietos ☐ Chamamento ☐ Olha ☐
Calmo ☐
Treino Avançado de Obediência: _____

Utiliza marcadores: Sim ☐ Não ☐ Qual? _____

Identifica como comando de libertação: Sim ☐ Não ☐

Velocidade de ação: Sim ☐ Não ☐

Procura recompensa após marcador: Sim ☐ Não ☐

Declaro que autorizo a participação do meu cão no estudo acima indicado e que permito a recolha de uma amostra sanguínea para o mesmo.

_____/_____/_____
Assinatura _____

DATA DA COLHEITA	HORA